



HAL
open science

La perturbation du comportement alimentaire des Hémiptères ravageurs : un levier pour favoriser la protection biologique des vergers

Thomas Denoirjean

► To cite this version:

Thomas Denoirjean. La perturbation du comportement alimentaire des Hémiptères ravageurs : un levier pour favoriser la protection biologique des vergers. Agronomie. Université de Picardie Jules Verne, 2022. Français. <NNT : 2022AMIE0069>. <tel-04142529>

HAL Id: tel-04142529

<https://theses.hal.science/tel-04142529v1>

Submitted on 27 Jun 2023

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.



HAL Authorization



Thèse de Doctorat

*Mention Sciences agronomiques et écologiques
Spécialité Sciences Ecologiques AgroEcologie et Ecophysiologie*

présentée à l'Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)

de l'Université de Picardie Jules Verne

par

Thomas DENOIRJEAN

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

*La perturbation du comportement alimentaire
des Hémiptères ravageurs : un levier pour favoriser
la protection biologique des vergers*

Soutenue le 30/11/2022, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen
présidé par M^{me} S. ANTON :

M^{me} S. ANTON, Directrice de recherche, INRAE – Angers

M. F. VERHEGGEN, Professeur, Université de Liège

M^{me} H. GAUTIER, Directrice de recherche, INRAE – Avignon

M. J. MOREAU, Maître de Conférences HDR, Université de Bourgogne

M. A. AMELINE, Maître de Conférences HDR, UPJV

M^{me} G. DOURY, Maître de Conférences, UPJV

Rapporteure

Rapporteur

Examinatrice

Examinateur

Directeur de thèse

Co-encadrante



PROVERBIO

Remerciements

Ce travail de thèse a été financé par le programme de coopération territoriale européenne Interreg France-Wallonie-Vlaanderen, et les travaux ont été effectués dans le cadre du projet Interreg « Protection des vergers par lutte biologique : une sélection adaptée des auxiliaires » (PROVERBIO) (<https://www.interreg-fwvl.eu/fr/proverbio>). Je tiens à remercier Thierry HANCE, porteur du projet Interreg PROVERBIO, pour la qualité de son travail dans la conduite bienveillante du projet, sa disponibilité et sa confiance quant à mes travaux.

Ce travail a été réalisé dans l'UMR CNRS 7058 Ecologie et Dynamique des Systèmes Anthropisés (Edysan), au sein de l'Université de Picardie Jules Verne. Je tiens donc à remercier le Professeur Guillaume DECOCQ, Directeur de l'unité, de m'avoir accueilli au sein d'EDYSAN. Un grand merci à mes deux Directeurs de thèse, Arnaud AMELINE et Géraldine DOURY. Je suis convaincu que la qualité des travaux de thèse dépend énormément de la qualité de l'encadrement, je vous remercie donc sincèrement pour votre disponibilité sans faille ainsi que vos conseils scientifiques au long de ces trois années. Sans vous, je ne serai pas allé aussi loin dans ces travaux, et votre complémentarité a été une vraie richesse.

Je souhaite remercier Sylvia ANTON, Directrice de recherche à l'INRAE – Angers et François VERHEGGEN, Professeur à l'Université de Liège, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je tiens également à remercier Hélène GAUTIER, Directrice de recherche à l'INRAE – Avignon et Jérôme MOREAU, Maître de conférences HDR à l'Université de Bourgogne, d'avoir accepté de juger mes travaux de recherche.

Je remercie vivement Anne-Marie CORTESERO, Professeure à l'Université de Rennes 1 et Jérôme MOREAU, Maître de conférences HDR à l'Université de Bourgogne pour leurs suggestions durant mon comité de thèse.

Je remercie également Andrew ROOTS pour ses relectures attentives des articles et ses suggestions concernant la langue anglaise.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont collaboré avec moi durant ces trois années, Amandine CORNILLE et son équipe ECLECTIC (Ecological genomics of multi-species interactions), François COUTTE de l'Institut Charles Viollette, Guillaume LE GOFF de l'Université Catholique de Louvain, Adrien GASCHEN de Viridaxis, Aude COUTY et Fabien SPICHER d'Edysan ainsi que Kévin TOUGERON durant son post-doctorat au sein de l'unité. Je tiens tout particulièrement à remercier Quentin CHESNAIS, Pedro POLI, Guillaume LE GOFF et Kévin TOUGERON pour leur aide en analyse statistique.

J'adresse de grands remerciements à Yvelise FOURDRAIN pour son aide dans l'entretien des plantes et des élevages dans les premières années de ma thèse, et à Françoise DUBOIS pour avoir pris sa suite sur ces tâches ainsi que pour son aide précieuse tout au long de la thèse dans la mise en place de certains dispositifs expérimentaux. Un grand merci aussi à Marie-Pierre

BOLEY pour son accompagnement administratif. Merci à toutes les trois pour votre disponibilité et votre soutien.

Je remercie également Mélanie RIVIERE et Charlotte ENGELS, qui ont activement contribué à la réalisation des travaux de cette thèse durant leur stage. J'ai réellement apprécié travailler avec vous, et j'espère que vous garderez un bon souvenir de votre passage au labo. Un grand merci à vous deux ainsi qu'à Xavier BAUDRY pour l'alternance des astreintes le weekend, qui m'a permis de souffler un peu.

Je remercie les collègues d'Edysan pour leur accueil : Patrice, Caroline, Ronan, Diane, Marine, Vincent, Anas, Boris, Thomas, Annie. Merci aux doctorants, stagiaires et temporaires d'Edysan que j'ai côtoyés au cours de ces trois années : Pedro, Gauthier, Romain, Candice, Kévin, Marion, Chloé, Nelly, Yuna, Theo, Louise, Benoît, Fausta. Merci pour tous les moments de soutien mutuel, au bar comme au Sushirama, qui ont été d'une grande aide. Je remercie tout particulièrement Pedro et Gauthier pour leur accueil chaleureux à mon arrivée sur Amiens, je me suis rapidement plu dans cette nouvelle ville notamment grâce à vous.

Je remercie ma famille de m'avoir encouragé et soutenu durant ces trois années, et pour tout ce qu'ils ont pu faire pour m'aider à m'épanouir et me développer. Petite dédicace à ma grand-mère que je prends toujours un malin plaisir à contredire mais l'âne de la famille est allé un peu plus loin que ce qui avait été anticipé ! Un grand merci à mes amis, les vieilles branches de Limoges et les joyeux larrons de VetAgro Sup, pour les moments de retrouvailles et leur amitié indéfectible. Merci aux bretons de Kerpuic pour les étés chaleureux passés ensemble au Mériadec. Merci à Nolwenn pour son soutien. Merci au crew jeux de société d'Amiens pour ces belles soirées ludiques. J'ai une pensée toute particulière pour Fiore, les copains de bataille d'Exactor Mortis (combattants comme bénévoles) et les partenaires d'entraînement de Boxfit (dont le légendaire coach Tim) pour leur vaillance et les secondes familles qu'ils constituent. Merci à Prim pour sa compagnie espiègle.

Table des matières

Avant-propos	1
Introduction	2
Chapitre I. Synthèse Bibliographique	4
I. 1. Le comportement alimentaire des Hémiptères, une composante primordiale de la colonisation de leur plante hôte	4
I. 1. a. Les pièces buccales des Hémiptères, un appareil adapté au mode alimentaire piqueur/suceur	4
I. 1. b. Les tissus du végétal parcourus par les stylets	5
I. 1. c. L'électropénétrographie, une méthode de choix pour l'étude du comportement alimentaire des insectes piqueurs/suceurs phloémophages : exemple des pucerons	8
I. 1. d. La part de l'alimentation dans le comportement de sélection de la plante par les Hémiptères : exemple des pucerons	12
I. 1. e. Le comportement alimentaire des pucerons et son impact sur les traits d'histoire de vie	14
I. 2. Leviers agronomiques existants basés sur l'altération du comportement alimentaire des pucerons	15
I. 2. a. Perturbation de l'environnement odorant	15
I. 2. b. Effets des traitements phytosanitaires et conséquences sur le comportement alimentaire	17
I. 2. c. Résistance des plantes cultivées et impacts sur le comportement alimentaire	20
I. 3. Leviers explorés au cours de la thèse au regard de la synthèse bibliographique	24
Chapitre 2. Matériels et Méthodes expérimentales	26
II. 1. Modèles biologiques	26
II. 1. a. Les plantes hôtes	26
II. 1. b. Les Hémiptères phloémophages	28
II. 1. c. Les parasitoïdes de pucerons : <i>Aphidius matricariae</i> et <i>Ephedrus cerasicola</i>	31
II. 2. : Méthodes expérimentales	31
II. 2. a. Etudes physiologiques et morphométriques	33
II. 2. b. Etudes comportementales sur les insectes	35
II. 2. c. Analyses biochimiques	38
II. 2. d. Analyses statistiques	38

Chapitre 3. Les huiles essentielles : des perturbateurs du comportement des Hémiptères	42
Présentation de l'étude et principaux résultats :	43
Article n°1.....	46
Article n°2.....	66
Chapitre 4. Perturbation par les biopesticides : exemple des lipopeptides	90
Présentation de l'étude et principaux résultats :	91
Article n°3.....	94
Article n°4.....	112
Chapitre 5. Perturbations comportementales à travers la résistance des plantes et conséquences sur les interactions multitrophiques.....	131
Présentation de l'étude et principaux résultats :	132
Article n°5.....	136
Article n°6.....	159
Discussion générale.....	182
Les huiles essentielles, des composés aux effets diversifiés altérant in fine la colonisation de la plante hôte par les Hémiptères phloémophages.....	182
Les Surfactines, les lipopeptides avec la plus forte activité aphicide mais aux effets sublétaux contrastés	187
La perturbation du comportement alimentaire de <i>D. plantaginea</i> par les pommiers est essentiellement basée sur des facteurs de résistance présents dans le phloème, mais a peu de conséquence sur la performance	192
Conclusion générale	199
Références bibliographiques	203

Index des figures

Figure 1 : Représentation schématique des pièces buccales d'un Hémiptère (1 à 4). (1) Lèvre supérieure ou labre. (2) Lèvre inférieure ou labium, longue et en forme de gouttière. (3) et (4) Stylets mandibulaires et maxillaires. (5) Yeux composés. (6) Petits yeux ou ocelles. (7) Base de l'antenne (Darling, n.d.)	5
Figure 2 : Organisation générale des pièces buccales d'un Hémiptère phytophage ; exemple des pucerons. D'après Leclant (1981).	5
Figure 3 : Coupe transversale de limbe d'Eudicotylédone (Boutin <i>et al.</i> , 2010).	7
Figure 4 : a) Micrographie d'une coupe longitudinale de la tête d'un puceron et d'une feuille au moment de l'alimentation d'un puceron, observés en microscopie optique. Le stylet du puceron dépasse du rostre (A) et pénètre de manière intercellulaire à travers les cellules du mésophylle (B) et dans le phloème (C) (Gray & Banerjee, 1999). b) Représentation schématique de l'anatomie d'un puceron, mettant en évidence les glandes salivaires, les organes impliqués dans l'ingestion, et le chemin des stylets au sein de la plante (Dixon, 1973).	7
Figure 5 : Schéma simplifié du circuit EPG (EPG Systems, n.d.)	9
Figure 6 : Aperçu des principales ondes EPG et de l'activité correspondante des stylets dans les tissus végétaux (Leybourne & Aradottir, 2021)	11
Figure 7 : Bilan des ondes EPG actuellement décrites et étudiées chez les pucerons phloémophages ("Entomological classics – Aphids spit," 2018)	12
Figure 8 : Leviers étudiés permettant la régulation des Hémiptères phloémophages et répercussions éventuelles sur la lutte biologique via les auxiliaires	24
Figure 9 : Elements potentiellement responsables des effets perturbateurs supposés des leviers testés sur le comportement alimentaire des Hémiptères phloémophages et répercussions éventuelles sur la lutte biologique via les auxiliaires	25
Figure 10 : Cycle de vie de <i>D. plantaginea</i> (Warneys <i>et al.</i> , 2018).....	29
Figure 11 : Cycle de <i>C. pyri</i> (Tougeron <i>et al.</i> , 2021)	30
Figure 12 : a) Schéma (Chesnais, 2016) et b) photographie d'un dispositif de suivi des pucerons en « clip-cage »	33
Figure 13 : Représentation schématique du dispositif d'étude du choix des pucerons ou des psylles.....	35
Figure 14 : Photographie du dispositif EPG, système <i>Malus domestica/Dysaphis plantaginea</i>	37
Figure 15 : Leviers basés sur l'utilisation d'huiles essentielles.....	42
Figure 16 : Leviers basés sur l'utilisation des bio-pesticides.....	90
Figure 17 : Leviers basés sur la résistance de la plante.....	131

Avant-propos

Le programme de coopération territoriale européenne Interreg France-Wallonie-Vlaanderen couvre cinq régions frontalières : les Régions Hauts-de-France et Grand Est en France ; la Wallonie, la Flandre occidentale et Flandre orientale en Belgique. Il vise à associer des compétences communes tout en valorisant les richesses de chaque région concernée, et ce, au bénéfice des populations de la zone. Au total, 170 millions d'euros provenant du Fonds européen de développement régional (FEDER) ont été alloués au programme Interreg V sur la période 2014-2020 pour soutenir des projets répondant à différents thèmes de coopération, notamment en ce qui concerne les travaux décrits dans ce manuscrit le thème « recherche, innovation et transfert de technologies ».

Le projet Interreg PROVERBIO (Protection des vergers par lutte biologique : une sélection adaptée des auxiliaires), qui a financé cette thèse, bénéficie d'un financement de 1 144 776,90 € du 01/01/2019 au 31/12/2022. Ce projet est porté par l'équipe Earth and Life Institute de l'Université Catholique de Louvain (Wallonie) et regroupe les opérateurs partenaires suivants : l'UMR CNRS 7058 Ecologie et Dynamique des Systèmes Anthropisés (Edysan), Université de Picardie Jules Verne (Hauts-de-France) ; Inagro (Flandre occidentale), PCFruit (Flandres, Hors zone) ; l'équipe ECLECTIC - Ecological genomics of multi-species interactions de l'UMR Génétique Quantitative et Évolution-Le Moulon, Université Paris-Saclay - INRAE - CNRS - AgroParisTech (Hors zone), ainsi que les opérateurs associés suivants : Viridaxis, Gawi et Centre fruitier wallon (Wallonie). Le projet PROVERBIO vise la mise au point d'approches de biocontrôle innovantes combinant l'utilisation d'insectes parasitoïdes adaptés aux régions couvertes par le programme et le recours à des variétés résistantes afin de lutter contre les ravageurs de poiriers, de pommiers et fraisiers. Dans ce projet, l'UMR « Écologie et Dynamique des Systèmes Anthropisés » (Edysan) apporte son expertise en écologie des interactions multitrophiques dans les agroécosystèmes. A l'aide d'approches biochimiques, physiologiques et comportementales, l'unité étudie les interactions entre plantes cultivées, ravageurs et auxiliaires.

Introduction

De nombreux arboriculteurs professionnels sont en attente de nouveaux modes de lutte permettant le contrôle efficace des ravageurs de manière « propre » et durable. Actuellement, la lutte contre les insectes ravageurs en vergers reposant largement sur des traitements insecticides extrêmement coûteux entraîne des effets secondaires sur la santé des travailleurs/consommateurs, la qualité des fruits (présence de résidus chimiques), la biodiversité en milieu agricole ou encore la qualité des eaux (pollution) (Karlsson Green *et al.*, 2020). Cet important recours aux insecticides peut s'expliquer par le fait que bien qu'il existe plus de 10 000 variétés différentes de pommes au niveau mondial (Amandine Cornille *et al.*, 2013), la production se base sur un nombre restreint de variétés, telles que Golden Delicious, Gala ou encore Jonagold (Badenes & Byrne, 2012). Ces cultivars sont cependant connus pour leur grande sensibilité aux ravageurs (Miñarro & Dapena, 2007; Bálint *et al.*, 2013; Arnaudov & Kutinkova, 2006), hors ces dernières années, de plus en plus de produits insecticides ont été interdits (directive européenne 2009/128/CE, Ecophyto (France), NAPAN (Belgique)). Afin d'éviter ou limiter l'utilisation de insecticides de synthèse, diverses alternatives à court, moyen ou long terme peuvent être envisagées.

A court terme, afin de rendre les cultivars fortement commercialisés plus résistants aux ravageurs, des composés répulsifs ou antiappétants comme les huiles essentielles peuvent être utilisés pour protéger les cultures. En attendant une transition vers des systèmes de production sans traitement, les insecticides de synthèses peuvent être remplacés par ces insecticide d'origines naturelles, considérés comme moins néfastes pour l'environnement (Kumar & Singh, 2015). En dehors des huiles essentielles, d'autres composés peuvent être utilisés en tant que biopesticides, à l'instar de bactéries et leurs métabolites.

Sur des pas de temps plus longs, le développement de la résistance intrinsèque des variétés de pommier est un levier à explorer. La recherche de facteurs de résistance notamment vis-à-vis des ravageurs peut être conduite à différents niveaux de diversité génétique. A moyen terme et à un niveau intraspécifique, il faudrait étudier les variétés résistantes de pommiers parmi celles déjà disponibles mais peu utilisées. Elles pourraient être cultivées ou exploitées dans le cadre de l'amélioration variétale. A plus long terme et à un niveau interspécifique, les espèces de pommiers sauvages représentent une autre source de facteurs de résistance à destination de l'amélioration variétale.

Ces leviers – utilisation des huiles essentielles, recours aux biopesticides et amélioration variétale – visent directement le ravageur, ou se basent sur la plante hôte pour réguler les ravageurs via un effet ascendant (bottom-up). A court et moyen terme la gestion des ravageurs peut aussi passer par l'utilisation de prédateurs et de parasitoïdes (contrôle top-down) ; cependant les différents leviers précédemment décrits, en modifiant la quantité et la qualité des proies/hôtes disponibles, peuvent négativement impacter les méthodes top-down. Ainsi, il peut être important d'étudier les effets des méthodes de contrôle via les pucerons sur ces ennemis

naturels pour clarifier d'éventuels antagonismes entre un contrôle bottom-up et top-down des ravageurs.

Le comportement alimentaire est un élément important dans la colonisation des plantes hôtes par les Hémiptères phloémophages et plusieurs méthodes de protection des cultures permettent de perturber ce comportement. Dans ce travail de thèse, nous souhaitons donc évaluer si l'efficacité de différentes méthodes de contrôle des Hémiptères phloémophages de vergers peut être expliquée par les modifications du comportement alimentaire qu'elles engendrent.

Le chapitre 1 consiste en une synthèse bibliographique qui traitera du comportement alimentaire des Hémiptères et des leviers agronomiques existants basés sur l'altération de ce comportement. Le chapitre 2 présentera le matériel biologique et les méthodes expérimentales utilisés durant le projet de thèse. Les chapitres 3, 4 et 5 présenteront les études en lien avec les leviers agronomiques précédemment décrits. Ils seront suivis d'une discussion des résultats obtenus dans les différentes études, puis d'une conclusion générale sur les travaux effectués.

Chapitre I. Synthèse Bibliographique

I. 1. Le comportement alimentaire des Hémiptères, une composante primordiale de la colonisation de leur plante hôte

Les Hémiptères sont des insectes qui se caractérisent par des pièces buccales ayant évolué du type primitif broyeur au type piqueur-suceur. Ces pièces buccales, appelées stylets, sont adaptées pour la consommation de sources d'alimentation liquide. Au-delà des hématophages et des entomophages, les Hémiptères les plus étudiés sont les phytophages : en effet, comprendre les facteurs influençant leur sélection des plantes est primordial pour envisager des moyens de contrôle de ces insectes, dont nombreux sont des ravageurs des cultures.

I. 1. a. Les pièces buccales des Hémiptères, un appareil adapté au mode alimentaire piqueur/suceur

La morphologie et l'ultrastructure des pièces buccales des Hémiptères ont été abondamment décrites, notamment chez les pucerons, en se basant sur des études réalisées en microscopie optique et électronique, à transmission ou à balayage (Garzo *et al.*, 2012). Les pièces buccales suceuses-piqueuses des Hémiptères présentent des structures similaires entre différentes familles. Les pièces buccales sont composées de trois éléments différents : un labre court et triangulaire, qui recouvre la base du faisceau de stylets ; un labium, qui est un organe segmenté et tubulaire doté d'une musculature complexe qui se contracte et se raccourcit lors de l'insertion des stylets dans le tissu végétal ; et un faisceau de stylets insérés dans une rainure située sur la longueur de la surface interne du labium (Figure 1). Le faisceau de stylets comporte deux stylets mandibulaires externes qui entourent et protègent deux stylets maxillaires internes (Leopold *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2010). Toute la longueur de la face interne des deux stylets maxillaires est sculptée par des crêtes et des rainures longitudinales, s'emboîtant à la manière d'une fermeture éclair du fait de leur structure complémentaire. Une fois emboîtée, cette architecture complexe laisse des conduits vides, correspondant à un grand canal alimentaire, et à un petit canal salivaire (Forbes, 1969). Les canaux alimentaires et salivaires sont séparés sur toute la longueur des stylets, à l'exception des derniers microns distaux, où ils fusionnent en un seul grand canal (Mittler, 1957) appelé canal commun. Comme l'illustre la Figure 2, les faces internes des deux stylets maxillaires sont asymétriques : le canal salivaire n'est présent que dans un seul des deux stylets, l'opposé le fermant par une crête.

Les Hémiptères phytophages utilisent leurs stylets pour atteindre différents tissus de la plante et se nourrir des liquides qu'ils contiennent. Les organes de la plante sur lesquels les Hémiptères se développent et les tissus ciblés peuvent grandement varier entre les espèces d'Hémiptères.

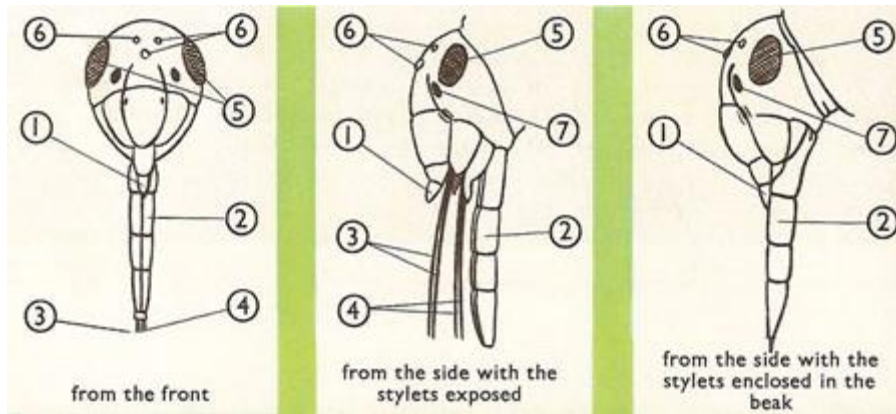


Figure 1 : Représentation schématique des pièces buccales d'un Hémiptère (1 à 4). (1) Lèvre supérieure ou labre. (2) Lèvre inférieure ou labium, longue et en forme de gouttière. (3) et (4) Stylets mandibulaires et maxillaires. (5) Yeux composés. (6) Petits yeux ou ocelles. (7) Base de l'antenne (Darling, n.d.)

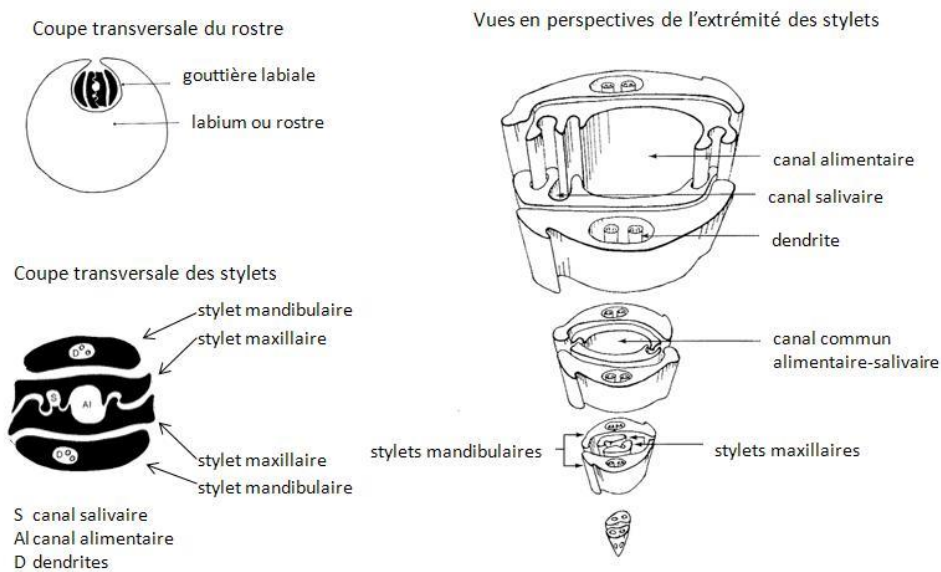


Figure 2 : Organisation générale des pièces buccales d'un Hémiptère phytophage ; exemple des pucerons. D'après Leclant (1981).

I. 1. b. Les tissus du végétal parcourus par les stylets

Les tissus du végétal traversés par les stylets de l'insecte varient en fonction des compartiments exploités :

- Chez les Hémiptères phyllophages il existe différentes stratégies d'alimentation. Certains vont se nourrir des sèves présentes dans les vaisseaux conducteurs : soit de la sève élaborée dans le phloème, comme l'essentiel des pucerons (Sternorrhyncha), ou de la sève brute

conduite par le xylème (ce mode d'alimentation étant observé uniquement chez les Auchenorrhyncha (Press & Whittaker, 1993)). Comme on peut l'observer sur la Figure 3, les stylets doivent d'abord traverser la cuticule, l'épiderme et le mésophylle pour atteindre les vaisseaux conducteurs (Miles, 1999; Raven, 1983). Certaines espèces de cochenilles (Sternorrhyncha) s'alimentent en lacérant les cellules du parenchyme puis en ingèrent le contenu (Rosen, 1990), à l'image de la plupart des Héteroptères. Dans ce cas, les stylets pénètrent seulement l'épiderme de la plante pour atteindre le tissu dans lequel l'alimentation aura lieu, perçant de façon continue ou intermittente les tissus tout en lacérant mécaniquement les cellules (Backus *et al.*, 2005a, 2005b). Les stylets des pucerons phloémophages progressent, après leur insertion à travers la cuticule et l'épiderme, dans les espaces intercellulaires du mésophylle pour atteindre le phloème. La Figure 4 présente des coupes longitudinales de tête d'un puceron et d'une feuille et met en avant le chemin emprunté par les stylets au sein de la plante. Lors de leur activité alimentaire, les pucerons phloémophages produisent deux types de sécrétions salivaires. Le premier type de salive se solidifie autour des stylets pour former une gaine salivaire (Bonani *et al.*, 2010; Miles, 1999). Cette gaine facilite le déplacement en douceur des stylets dans le mésophylle et minimise la réponse de la plante hôte aux blessures. Ces gaines salivaires sont même sécrétées lorsque les pucerons s'alimentent dans des diètes artificielles (mélange de sucres et d'acides aminés imitant la sève phloémienne) : les stylets ne sont pas insérés au-delà de l'extrémité de la gaine salivaire (Miles, 1972). Avant d'atteindre le phloème, les stylets échantillonnent le contenu de cellules de l'épiderme et du mésophylle et obtiennent ainsi des indices qui facilitent la décision dans la poursuite ou l'arrêt de la sélection de la plante hôte (Tjallingii & Esch, 1993). Les indices comprennent des métabolites secondaires impliqués dans l'interaction entre la plante et les pucerons, tels que les flavonoïdes (dont les dérivés d'acides hydroxycinnamiques et les glycosides de flavonols) et les glucosinolates (Rechner *et al.*, 2016). Ces métabolites peuvent impacter le comportement alimentaire des pucerons et sont détectés par des sensilles chimiosensorielles présentes dans un organe gustatif situé dans la région antérieure du canal alimentaire (Wensler & Filshie, 1969). La nature internalisée et inaccessible des sensilles gustatives des pucerons limite la compréhension du fonctionnement de ces récepteurs et, par conséquent, la compréhension de la gustation chez les pucerons. Le second type de salive, la salive aqueuse, est libéré lorsque l'extrémité des stylets est à l'intérieur d'une cellule. Elle contient des protéines et des éliciteurs qui modulent la physiologie de la plante hôte au profit des pucerons et facilitent une alimentation soutenue dans le phloème (Tjallingii, 2006; Will *et al.*, 2007).

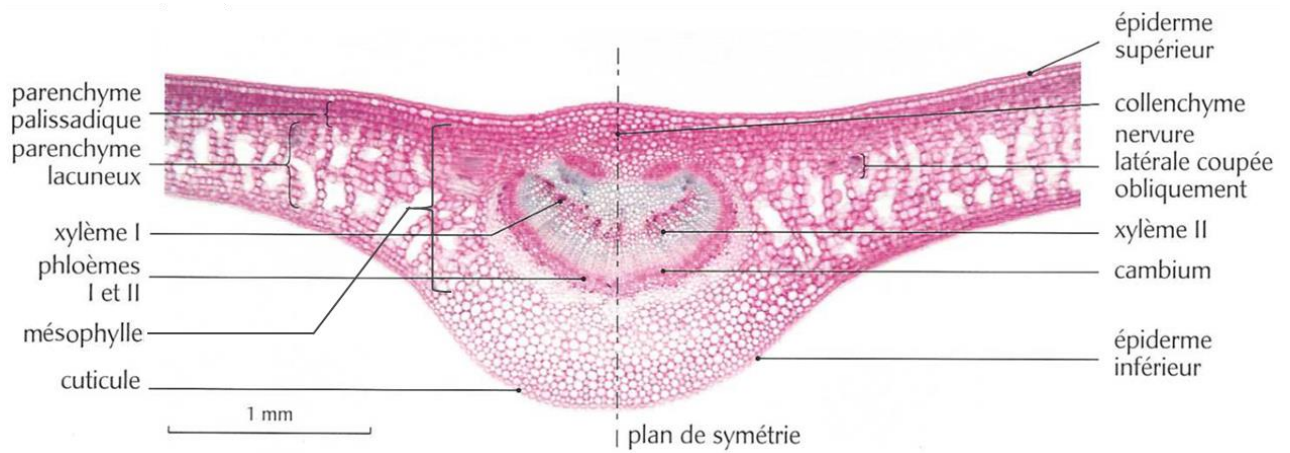


Figure 3 : Coupe transversale de limbe d'Eudicotylédone (Boutin et al., 2010).

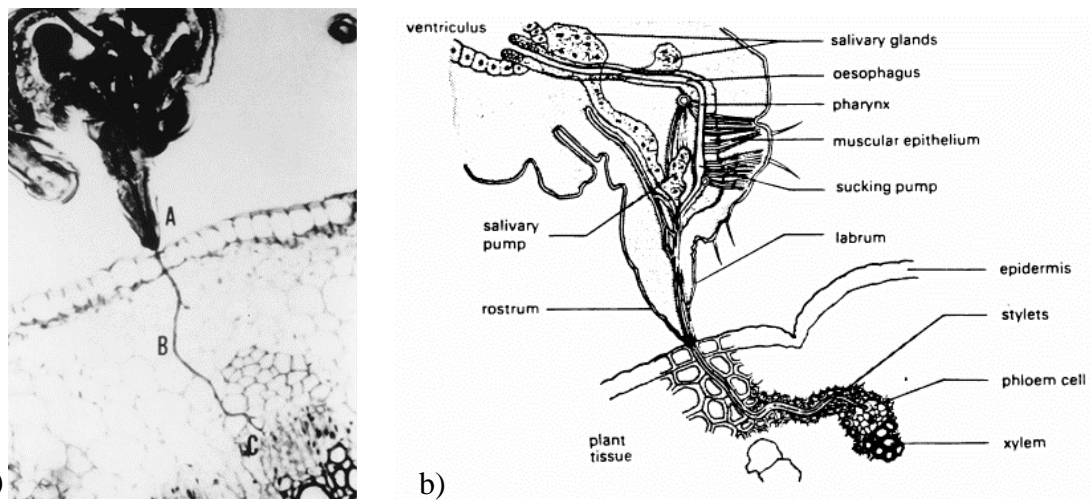


Figure 4 : a) Micrographie d'une coupe longitudinale de la tête d'un puceron et d'une feuille au moment de l'alimentation d'un puceron, observés en microscopie optique. Le stylet du puceron dépasse du rostre (A) et pénètre de manière intercellulaire à travers les cellules du mésophylle (B) et dans le phloème (C) (Gray & Banerjee, 1999). b) Représentation schématique de l'anatomie d'un puceron, mettant en évidence les glandes salivaires, les organes impliqués dans l'ingestion, et le chemin des stylets au sein de la plante (Dixon, 1973).

- D'autres Hémiptères peuvent se développer aux dépens des éléments lignifiés (tronc, branches). Certains des pucerons qui s'alimentent sur les tissus ligneux sont capables d'atteindre le phloème parce qu'ils sont de grande taille et qu'ils présentent des stylets mesurant environ deux fois la longueur du corps (Dick, 1997). Les stylets doivent dans ce cas franchir l'épiderme, le collenchyme et le parenchyme pour pouvoir atteindre le phloème. D'autres espèces de pucerons qui se développent sur les racines ou les tiges et se nourrissent

de tissus ligneux forment des galles, comme le puceron lanigère du pommier *Eriosoma lanigerum* (Aphididae) Hausmann (Brown *et al.*, 1991) et le phylloxéra de la vigne *Daktulosphaira vitifoliae* (Phylloxeridae) Fitch (Kellow *et al.*, 2004; Kingston *et al.*, 2007). Enfin, le puceron lanigère du peuplier *Phloeomyzus passerinii* (Aphididae) Signoret se développe sur les troncs des peupliers, où il se nourrit dans le parenchyme cortical ou de galles (Pointeau *et al.*, 2012). L'originalité dans le chemin emprunté par les stylets de *P. passerinii* réside dans le fait qu'il est à la fois inter et intracellulaire, et après avoir pénétré l'épiderme les stylets franchissent le collenchyme pour atteindre le parenchyme.

I. 1. c. L'électropénétrographie, une méthode de choix pour l'étude du comportement alimentaire des insectes piqueurs/suceurs phloémophages : exemple des pucerons

L'étude du comportement alimentaire des pucerons phloémophages était initialement réalisée à l'aide de deux techniques. La première permettait d'évaluer indirectement la quantité de sève ingérée par les pucerons, en estimant la quantité de miellat sécrété. Dans certains dispositifs, un papier filtre traité avec un indicateur de pH était placé en dessous des plantes ; ainsi les gouttelettes de miellat excrétées par les pucerons étaient immédiatement visibles sous forme de taches bleues lorsqu'elles touchaient le papier (Auclair, 1959). Des observations toutes les heures permettaient de déterminer la fréquence d'excrétion de miellat. La quantité de miellat excrété pouvait aussi être évaluée en extrayant le miellat des papiers filtres sur lesquels il était récolté (Nisbet *et al.*, 1994; M. Rodríguez *et al.*, 2018). Cette méthode restait cependant limitée, car bien qu'elle renseignait sur le résultat de l'activité alimentaire des pucerons, elle ne permettait pas de décomposer l'activité des stylets dans les différents tissus de la plante. Ainsi, la deuxième technique consistait en la coloration des gaines salivaires présentes dans les feuilles, leur identification permettant de savoir quels tissus ont été explorés par les stylets. Les feuilles infestées étaient excisées des plantes et immédiatement plongées dans une solution de coloration (par exemple de bleu de Coomassie ou de fuchsine acide) pendant une certaine durée, puis rincées et déshydratées pour une observation sous microscope (Khan & Saxena, 1986; Ni & Quisenberry, 1997). Bien que cette technique permettait de caractériser le nombre de piqûres et le trajet des stylets dans les tissus, elle ne livrait cependant qu'une image à un temps donné de cette activité. Pour obtenir en temps réel l'activité des stylets dans les différents tissus de la plante, la méthode d'électropénétrographie a été développée.

Une des premières études d'électropénétrographie (EPG) a été publiée en 1964 par McLean & Kinsey. L'enjeu était, alors, de développer un outil afin d'étudier la salivation et l'alimentation des pucerons pour améliorer les connaissances en termes d'acquisition et de transmission de virus de plantes. Dans une étude suivante, les mêmes auteurs ont montré une corrélation entre la forme des signaux et la localisation de l'extrémité des stylets dans la plante (McLean & Kinsey, 1967).

Suite à cela, des recherches plus approfondies sur la signification des signaux observés en plante entière ont été menées, et le dispositif a été adapté pour une source de courant continu

(Tjallingii, 1978a, 1988). Comme dans le dispositif de McLean & Kinsey, un puceron et une plante sont intégrés à un circuit électrique en insérant une électrode dans le substrat de la plante en pot et en attachant un fil conducteur très fin à l'insecte. Ce fil est généralement constitué d'or et est collé à l'abdomen du puceron à l'aide d'une colle contenant des paillettes d'argent. Le circuit incorpore aussi une résistance électrique (R_i) et une source de tension (V_s), comme illustré sur la Figure 5. Dès que les pièces buccales du puceron sont insérées dans la plante, le circuit électrique est fermé et une tension fluctuante, appelée « signal EPG », se produit au point de mesure et est ensuite amplifiée et enregistrée. Les fluctuations de tension apparaissent dans un certain nombre de patterns distincts, appelés « ondes ». Les variations de tensions sont causées simultanément par deux sources différentes : premièrement, la résistance électrique fluctuante du puceron et deuxièmement, les tensions générées dans l'interaction puceron-plante. Ces deux sources génèrent des composantes du signal EPG, que l'on nomme respectivement composantes de force électromotrice (emf), et composantes de résistance électrique (R). Les composantes de la force électromotrice emf proviennent principalement des « potentiels de membrane » des cellules végétales lorsqu'elles sont perforées par les pointes des stylets et des « potentiels d'écoulement » causés par les mouvements de fluide dans les canaux salivaires et alimentaires des stylets. Les composantes R proviennent principalement de l'activité des valves dans les canaux des stylets, de la nourriture, et du canal salivaire. Les muscles et le système nerveux du puceron sont en dehors du circuit, et semblent ne pas contribuer au signal EPG. Aussi, le courant traversant le puceron est très limité et ne semble pas agir sur l'ingestion, la salivation, ou sur d'autres fonctions biologiques. Une valeur élevée de la résistance de l'amplificateur par rapport à celle du puceron favorise la composante emf, alors qu'au contraire une faible valeur accentue la composante de la résistance variable R . Bien que cette résistance variable R constitue en général la principale origine du signal EPG, tout ou partie de certaines ondes sont au contraire dues à la composante emf. Un montage en courant continu délivre un signal mieux caractérisé qu'un montage en courant alternatif, grâce à des propriétés de filtration de fréquence moins importantes (Tjallingii, 1985).

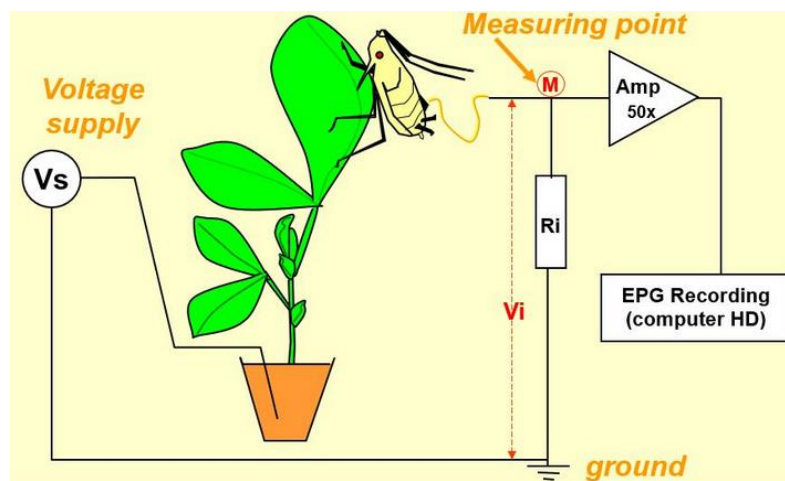


Figure 5 : Schéma simplifié du circuit EPG (EPG Systems, n.d.)

Tjallingi (1978) avait initialement identifié six ondes différentes, notées de A à F. Aujourd'hui, huit formes basées sur les travaux de Tjallingi (1987) sont retenues et classiquement utilisées (Figures 6 et 7) :

- Lors de l'insertion des stylets dans la plante, les ondes A, B et C s'enchainent. L'onde A correspond à la traversée de l'épiderme, qui est le premier tissu que rencontrent les stylets lorsqu'ils sont insérés dans la plante. L'onde B qui suit l'onde A représente la formation de la gaine salivaire. L'onde C traduit l'activité des stylets dans le mésophylle, qui prennent un chemin intercellulaire. Par commodité, les ondes A et B sont groupées avec les ondes C. En chemin, quasiment chaque cellule est ponctionnée le long du trajet des stylets (van Helden & Tjallingii, 1993). Ces perforations s'observent sur le signal EPG par une onde caractéristique appelée « potential drop » (pd) ou piqûre d'essai en français, qui dure généralement entre cinq et dix secondes. Trois sous-phases du potential drop sont décrites et corrélées pour la première à l'injection de salive dans la cellule, pour la seconde à une phase de transition entre salivation et ingestion de contenu cellulaire, et pour la troisième à seulement de l'ingestion. L'injection de salive à l'échelle intracellulaire est en relation avec l'inoculation de virus de plantes non-persistants, et l'ingestion du contenu cellulaire avec l'acquisition de ces virus (Martín *et al.*, 1997). L'onde F est associée au mécanisme de « déraillement des stylets ». Ce comportement est généralement attribué à des difficultés mécaniques dans la progression des stylets dans le mésophylle, bien que cela reste difficile à interpréter. Les stylets des pucerons peuvent avoir du mal à pénétrer les espaces intercellulaires du mésophylle s'ils perdent leur position dans la gaine salivaire ou si celle-ci n'est pas synthétisée (Tjallingii, 1988).
- Les activités phloëmiennes sont caractérisées par les ondes E1 et E2. Sans exception, la phase phloémienne débute par la sécrétion de salive (onde E1) et peut se poursuivre par l'ingestion de sève élaborée (onde E2). La sève élaborée est sous pression et son ingestion est considérée comme un processus passif (Mittler, 1957; Prado & Fred Tjallingii, 2007). Il semble que le puceron puisse réaliser de brèves ponctions dans les tubes criblés, sans qu'elles puissent être distinguées des ondes pd dans le signal EPG (Tjallingii & Esch, 1993).
- Les pucerons, bien qu'ils soient phloémophages, ingèrent aussi la sève brute conduite dans le xylème (Spiller *et al.*, 1990). L'ingestion xylémienne (onde G), contrairement à l'ingestion phloémienne, ne semble pas contribuer à l'alimentation en tant que telle chez les pucerons, mais semble compenser un stress hydrique, et ainsi devrait être considérée comme de « l'hydratation » plutôt que de l'alimentation. De plus, l'hydratation dans le xylème est liée à une ingestion active de la sève brute sous faible pression hydrostatique, contrairement à la sève phloémienne.

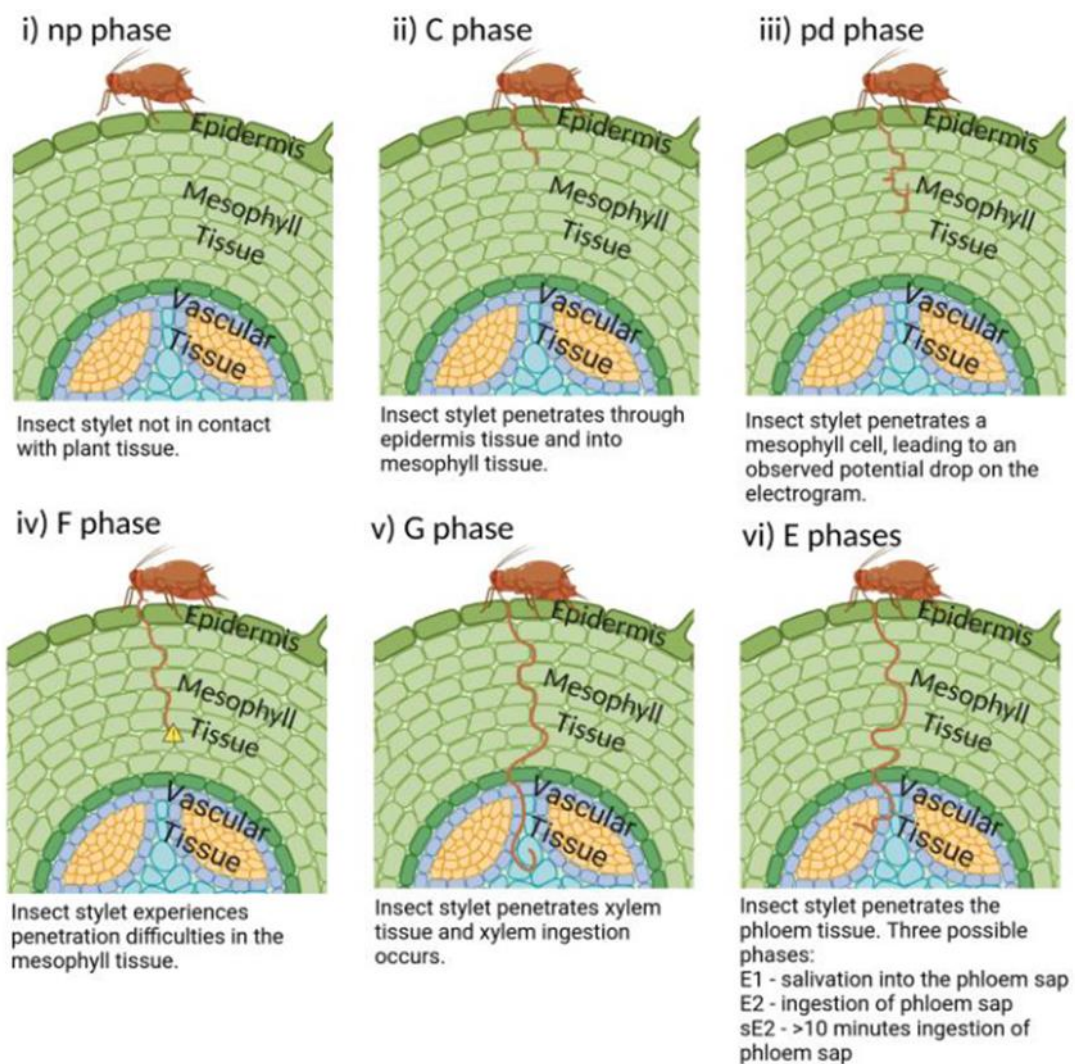


Figure 6 : Aperçu des principales ondes EPG et de l'activité correspondante des stylets dans les tissus végétaux (Leybourne & Aradottir, 2021)

Développée initialement pour étudier le comportement alimentaire des pucerons, l'électropénétrographie permet aujourd'hui de caractériser l'activité des stylets de différents Hémiptères dans la plante : des psylles (Civolani *et al.*, 2011; Youn *et al.*, 2011; Serikawa *et al.*, 2012), des aleurodes (Chesnais & Mauck, 2018), des cicadelles (Tariq *et al.*, 2017; Yorozya, 2017) et des punaises (Lucini & Panizzi, 2017, 2018). L'étude d'Hémiptères dont le profil alimentaire n'a pas encore été précédemment décrit nécessite de corréliser les ondes observées avec des activités des stylets dans les tissus de la plante, dans la mesure où la forme et l'amplitude des ondes peuvent fortement varier d'une espèce d'Hémiptère à une autre. La signification des différents signaux EPG observés peut être déterminée à partir : (1) de coupes histologiques au moment de l'apparition du signal à étudier, permettant la localisation de l'extrémité des stylets ou de la gaine salivaire dans les tissus de la plante, (2) de l'observation de comportements sur des milieux artificiels, pour isoler certains signaux (notamment ceux liés

à la salivation et l'ingestion) ou ceux dus à des mouvements particuliers des stylets et (3) des caractéristiques électriques des signaux (Walker, 2000).

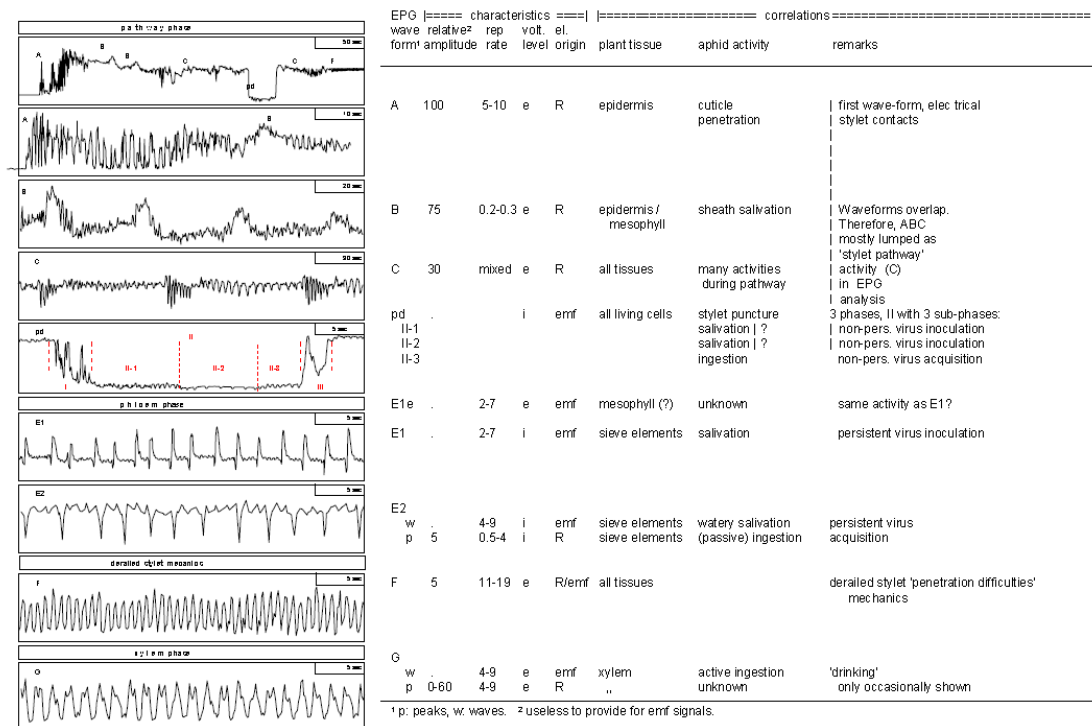


Figure 7 : Bilan des ondes EPG actuellement décrites et étudiées chez les pucerons phloémophages (“Entomological classics – Aphids spit,” 2018)

I. 1. d. La part de l'alimentation dans le comportement de sélection de la plante par les Hémiptères : exemple des pucerons

Le concept de sélection de la plante hôte a été très développé pour les pucerons, notamment par Powell *et al.* (2006). Elle se produit comme une séquence de comportements (Minks & Harrewijn, 1987), à l'issue desquels la plante peut être rejetée, ou un comportement antérieur repris, à n'importe quel stade de la séquence, suite à l'évaluation d'indices physiques et/ou chimiques. Comme pour d'autres insectes phytophages (Schoonhoven *et al.*, 1998), les informations phytochimiques sont particulièrement importantes pour déterminer le comportement des pucerons à de nombreuses étapes du processus de sélection des plantes hôtes (van Emden, 1972; Pickett & Wadham, 1992).

Powell *et al.* (2006) ont décrit six étapes principales dans le processus de sélection de la plante hôte par les pucerons :

- La première étape concerne principalement les morphes de pucerons ailés, qui sont adaptés à la dispersion et la sélection de nouvelles plantes hôtes. Le comportement avant l'atterrissage des pucerons volants implique une réponse phototactique aux longueurs

d'ondes réfléchies par les plantes (Hardie, 1989) et une réponse olfactive aux volatils émis par les plantes (Chapman *et al.*, 1981; Nottingham & Hardie, 1993).

- La deuxième étape consiste en le contact initial avec la plante, et l'évaluation de la surface avant l'insertion des stylets. En effet, divers signaux peuvent être détectés lorsque les pucerons marchent sur la surface de la plante. Les antennes permettent la détection d'odeurs près de la surface de la plante (Hardie & Powell, 2000; Storer *et al.*, 1996). L'évaluation des composés de surface se fait à l'aide de chimiorécepteurs présents sur les tarsi et sur les antennes des pucerons (Emden & Harrington, 2007).
- Les cires épicuticulaires, les exsudats de trichomes (Neal *et al.*, 1990), la texture de la surface de la feuille (Powell *et al.*, 1999) et la couleur (Pelletier, 1990) peuvent également influencer le comportement des pucerons avant l'insertion des stylets. Les stylets et le labium des pucerons possèdent des mécanorécepteurs mais sont apparemment dépourvus de chimiorécepteurs (Tjallingii, 1978b).
- Lors de la troisième étape, les pucerons sondent l'épiderme à l'aide de leurs stylets. Les quelques premières pénétrations des stylets initiées après le contact avec la plante sont généralement des sondages brefs, d'une durée inférieure à une minute, qui se limitent à l'épiderme.
- L'étape suivante consiste en une pénétration des stylets au-delà de l'épiderme dans le mésophylle.
- La pénétration des stylets dans le phloème, initialement suivie d'une injection de salive aqueuse (Prado & Tjallingii, 1994), constitue la cinquième étape du processus de sélection de la plante hôte. La salive aqueuse libérée peut inhiber les mécanismes défensifs d'occlusion des éléments criblés du phloème et permettre une extraction soutenue de sève.
- La dernière et sixième étape correspond à l'acceptation du phloème concrétisée par une ingestion soutenue. Les périodes de contact avec le phloème supérieures à environ 10 minutes peuvent traduire l'acceptation du phloème, car elles incluent presque toujours l'ingestion de sève phloémienne et sont susceptibles de se poursuivre pendant une période beaucoup plus longue, durant souvent plusieurs heures (Tjallingii, 1994).

I. 1. e. Le comportement alimentaire des pucerons et son impact sur les traits d'histoire de vie

Le comportement alimentaire des phloèmophages est un facteur primordial de la préférence et de l'acceptation de la plante hôte.

Le terme de préférence des plantes désigne les traits comportementaux des insectes qui déterminent la probabilité d'accepter une plante hôte (Singer *et al.*, 1992). Bien que les indices détectés avant l'insertion des stylets (étapes 1 et 2) jouent sans aucun doute un rôle dans le processus de sélection de l'hôte, des études sur le terrain et en laboratoire indiquent par exemple que les pucerons détectent les principaux facteurs influençant leur préférence après l'insertion des stylets. La colonisation des plantes hôtes appropriées se produit donc par un taux de départ différentiel après l'atterrissage sur les plantes hôtes/non-hôtes plutôt que par des taux d'arrivée différentiels. Une fois que les stylets du puceron ont atteint le phloème, il initie sa reproduction, et sa performance dépend de la valeur nutritive de la sève phloémienne (Niemeyer, 1990).

L'acceptation de la plante peut être définie en termes d'ingestion de nourriture et/ou de reproduction (Schoonhoven *et al.*, 1998). Pour les pucerons, l'initiation de la reproduction donne une indication particulièrement claire de l'acceptation de la plante hôte. Dans la séquence des étapes de sélection de l'hôte présentée plus haut, on suppose que l'initiation de la reproduction commence après la perforation d'un élément criblé du phloème et une alimentation soutenue (c'est-à-dire après l'étape 6) (Kobayashi & Ishikawa, 1993; MacKay & Downer, 1979). Cependant, des études portant sur les relations entre la pénétration des stylets et la reproduction des pucerons indiquent que l'initiation de la reproduction est stimulée par des signaux chimiques qui (a) sont détectés dans les tissus périphériques de la plante avant le contact avec le phloème et sont donc efficaces sans ingestion importante, (b) sont efficaces à faible concentration, et (c) conduisent au déclenchement de la reproduction avant une ingestion importante de nutriments (Powell & Hardie, 2001; Tosh *et al.*, 2002, 2003; Powell *et al.*, 2004). Une analyse détaillée de la façon dont les stylets des pucerons interagissent avec les tissus périphériques des plantes est donc nécessaire pour déterminer les principaux facteurs affectant la préférence et l'acceptation des plantes.

Les plantes peuvent affecter la biologie des pucerons via des mécanismes de défense. On parle d'antixénose dans les cas où une perturbation du comportement des pucerons conduit à une faible acceptation ou à une non-acceptation de la plante. L'antibiose, quant à elle, affecte les paramètres démographiques, et non les processus comportementaux impliqués dans l'acceptation de l'hôte (Panda & Khush, 1995). Une antixénose forte (par exemple, une absence d'alimentation dans le phloème) aura cependant des effets sur la physiologie et la démographie des insectes.

1. 2. Leviers agronomiques existants basés sur l'altération du comportement alimentaire des pucerons

Les pucerons phloémophages étant d'importants ravageurs des cultures, la gestion de leurs populations est souvent un enjeu primordial de la protection des cultures. Comme cela a été évoqué dans la précédente partie, le succès de colonisation dépend de la capacité des pucerons à s'alimenter de leur plante hôte. De plus, une altération de la préférence peut avoir des conséquences sur la performance des pucerons et donc sur les dégâts qu'ils engendrent. Ainsi, la capacité des leviers agronomiques à perturber le comportement alimentaire des pucerons phloémophages détermine et/ou contribue à leur efficacité.

1. 2. a. Perturbation de l'environnement odorant

L'olfaction est une modalité sensorielle essentielle pour les insectes phytophages. Leur environnement olfactif est principalement constitué de Composés Organiques Volatils (COV) émis par les plantes. La végétation produit une grande diversité de composés volatils, qui sont ensuite transportés, mélangés et dégradés dans l'atmosphère. Chaque espèce d'insecte possède un ensemble de récepteurs olfactifs qui fixent une partie des composés volatils présents dans son habitat. Les « paysages olfactifs » des insectes sont donc définis comme des espaces olfactifs spécifiques à chaque espèce, dépendants de l'habitat local et dynamiques dans le temps. La manipulation des « paysages olfactifs » des insectes et des ravageurs est une approche prometteuse pour répondre à la forte demande de stratégies de protection des plantes sans pesticides (Conchou *et al.*, 2019). Les COV jouent un rôle important dans l'écologie chimique des pucerons, notamment dans l'estimation de la qualité de leur habitat et la localisation de leur plante hôte (Bruce *et al.*, 2005). Certains bouquets d'odeurs peuvent également entraîner une réduction de la fécondité des pucerons (Ben Issa *et al.*, 2016). En effet, les performances d'un puceron varient en fonction des particularités de la plante hôte, mais également en fonction de son environnement. Dans des conditions favorables pour une dynamique de croissance optimale de la population, plusieurs études ont montré que l'exposition des pucerons à certains COV, ou au mélange de COV provenant de différentes sources (plantes entières, huiles essentielles, extraits de plantes ou composés individuels), affecte négativement leur reproduction (Hildebrand *et al.*, 1993; Tomova *et al.*, 2005; Ben Issa *et al.*, 2016, 2017).

Au-delà des effets des COV sur la physiologie des pucerons, ceux-ci peuvent impacter le comportement de colonisation de la plante hôte, soit au moment de sa localisation soit dans les étapes consécutives à l'atterrissage. Dans la nature, les pucerons perçoivent des COV attractifs ou neutres (Chapman *et al.*, 1981) mais aussi des COV répulsifs ou perturbateurs (Ben Issa *et al.*, 2016; Dardouri *et al.*, 2019), ces derniers étant généralement émis par des plantes non-hôtes. En plus de repousser les pucerons ailés pendant la phase de localisation de la plante hôte, ces volatils peuvent également faire fuir les pucerons aptères, même après leur installation sur la plante hôte. Pour étudier l'effet répulsif des COV émis par des plantes non-hôtes sur les

pucerons généralistes ou spécialistes, diverses expériences ont été réalisées avec des extraits de plantes ou des huiles essentielles, dans des études de terrain et de laboratoire (Nottingham *et al.*, 1991; Hori, 1998; Dancewicz *et al.*, 2011; Ikeura *et al.*, 2012). Parmi les volatils émis, certains composés ont particulièrement été mis en avant pour leurs effets répulsifs. Des tests en laboratoire ont montré que les isothiocyanates et le myrténal, qui sont des composés émis par les plantes de la famille des Brassicaceae, sont répulsifs pour le puceron de la fève noire *Aphis fabae* (Aphididae) Scopoli (Hardie *et al.*, 1994). De même, de nombreux terpénoïdes tels que l' α -pinène, le 1,8 cinéole ou le camphre ont un effet répulsif sur les pucerons (Hori, 1998; Ben Issa *et al.*, 2012, 2016).

En ce qui concerne les COV de plantes non-hôtes, Dardouri *et al.* (2021) ont révélé que les COV émis par des plantes compagnes (*i.e.* plantes de services), majoritairement des plantes aromatiques (lavande *Lavandula latifolia* (Lamiaceae) Medik., romarin *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) Spenn., basilic *Ocimum basilicum* (Lamiaceae) L. et œillet d'inde *Tagetes patula* (Asteraceae) L.), ont un effet sur le comportement alimentaire des pucerons *Myzus persicae* (Aphididae) Sulzer sur leur plante hôte (*i.e.* plante focale, en l'occurrence le poivron *Capsicum annuum* (Solanaceae) L. dans cette étude). L'activité des stylets est fréquemment interrompue (augmentation du nombre d'insertions/retraits des stylets de la plante) et elle est perturbée avant d'atteindre le phloème. De plus, la fréquence et la durée des phases de salivation de *M. persicae* sont significativement plus importantes quand la plante focale (poivron) est en présence de COV émis par des plantes compagnes. Une plante compagne coupée ou stimulée mécaniquement est une source d'autant plus efficace dans l'émission de COV et par conséquent dans les perturbations du comportement alimentaire qu'elle provoque chez les pucerons. Baudry *et al.* (2021) ont mis en évidence que la présence de poireau *Allium porrum* (Alliaceae) L. coupé induit une perturbation du comportement alimentaire de *M. persicae* élevé sur la plante focale (le poivron) : bien que le temps total alloué à l'activité globale des stylets dans la plante ne soit pas affecté, l'équilibre relatif entre le temps passé à ingérer la sève du phloème (E2) et le temps consacré à l'ingestion de la sève du xylème (G) est modifié. Ameline *et al.* (2022) ont montré que la stimulation mécanique du géranium *Geranium macrorrhizum* (Geraniaceae) L. diminue l'ingestion soutenue de sève phloémienne (sE2) de *M. persicae* sur poivron, plante focale. Ceci peut être imputé au germacrone et au β -élémnone, qui sont émis en plus grandes quantités suite à la stimulation mécanique des feuilles de la plante compagne. Un comportement similaire de *M. persicae* élevé sur *Brassica rapa* (Brassicaceae) L. été rapporté par Dancewicz *et al.* (2016) en présence de camphène et de β -ionone. Comme cela a pu être montré dans diverses études, des COV exogènes peuvent être adsorbés dans la cuticule des feuilles (Himanen *et al.*, 2010; Dahlin *et al.*, 2015; Camacho-Coronel *et al.*, 2020), ce qui peut perturber le comportement alimentaire des pucerons à la surface de la feuille. Aussi, la plante hôte peut émettre généralement en petites quantités des COV répulsifs (Renwick, 1989; Glinwood *et al.*, 2011) ; cette production de COV pourrait être augmentée par la présence de COV exogènes. Hu *et al.* (2018) ont émis une hypothèse similaire sur un lien possible entre une perturbation du comportement alimentaire d'*Aphis gossypii* (Aphididae) Glover et la production de nouveaux

composés volatils ou non volatils par la plante hôte. A l'inverse, des substances attractives peuvent réduire le temps avant la première insertion des stylets dans les tissus des plantes hôtes, comme cela a été signalé pour les composés volatils de la fève *Vicia faba* (Aphididae) Scopoli qui ont un effet attractif sur le puceron noir de la fève *A. fabae* (Webster *et al.*, 2008). Au-delà d'effets directs sur les pucerons, plusieurs mécanismes pourraient expliquer comment des COV exogènes peuvent transformer une plante hôte en hôte inadéquat. En effet, il n'est pas exclu que la perturbation du comportement alimentaire résulte de la stimulation de la défense de la plante focale via les COV de plantes exogènes. Karban *et al.* (2000) ont montré que les plants de tabac *Nicotiana tabacum* (Solanaceae) ont un niveau élevé de polyphénol oxydase lorsqu'ils sont cultivés en interculture avec *Artemisia tridentata* (Asteraceae) Nutt. subissant une section, ce qui réduit les dégâts causés par les Lépidoptères et les Orthoptères. Cela pourrait être dû à l'émission de jasmonate de méthyle résultant de cette lésion mécanique. Par exemple, le jasmonate de méthyle induit l'accumulation de protéines inhibitrices de protéases dans les plants de tomates *Solanum lycopersicum* (Solanaceae) L. (Farmer & Ryan, 1990). Dans plusieurs cas, le jasmonate de méthyle augmente l'émission de plusieurs COV impliqués dans la défense des plantes hôtes, comme la 6-Méthyl-5-heptène-2-one chez le poivron (Dewhirst *et al.*, 2012), le (E)-b-ocimène chez les haricots (Birkett *et al.*, 2000), ou les acides hydroxamiques chez le blé *Triticum aestivum* (Poaceae) L. (Slesak *et al.*, 2001).

I. 2. b. Effets des traitements phytosanitaires et conséquences sur le comportement alimentaire

De nombreux insecticides ont été développés sur la base de modes d'action ciblant des fonctions biologiques spécifiques de l'insecte. Certains ciblent le système nerveux des ravageurs, en affectant les activités du système nerveux via l'acétylcholine (ACh), en altérant sa dégradation (Das, 2013) ou sa liaison aux récepteurs (Lee Chao *et al.*, 1997; Yu & Killiny, 2018). D'autres inhibent la synthèse de chitine, et suite à une carence, la procuticule se rompt sous la pression du liquide exuvial et l'insecte devient incapable de muer (Das, 2013). Enfin, la pymétozine et le flonicamide entraînent une inhibition immédiate de l'alimentation, suivie d'une mort par famine (Harrewijn & Kayser, 1997; Cho *et al.*, 2011). Bien qu'ils aient des similitudes structurales avec les insecticides néonicotinoïdes, la pymétozine et le flonicamide n'ont pas d'activité sur les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (Morita *et al.*, 2007). Ils agissent en bloquant les canaux potassiques du système nerveux, ce qui a pour effet de créer une paralysie chez les pucerons et de fait affecte leur comportement alimentaire (Ko *et al.*, 2014; Morita *et al.*, 2007; Sadeghi *et al.*, 2009).

Les effets des pesticides sur le comportement alimentaire des pucerons sont décrits ci-dessous, en fonction de leur mode d'administration.

- **Enrobages de semences** : Des pesticides tels que les néonicotinoïdes peuvent être appliqués en enrobage de semence. Les substances actives ainsi appliquées sont ensuite absorbées par les racines et ont une activité systémique dans les plantes (Tooker *et al.*, 2017). Le thiaméthoxame est un néonicotinoïde avec une bonne mobilité dans la sève brute

du xylème en direction acropétale (des racines à l'apex de la plante) et est donc approprié pour le traitement des semences et l'application au sol. Ce traitement a pour effet une réduction de l'ingestion de sève brute chez le puceron du merisier à grappes *Rhopalosiphum padi* (Aphididae) L. (Cui *et al.*, 2010). D'autres pesticides systémiques comme la pymétozine ont une activité systémique dans la plante, et du fait de translocation de ces molécules depuis le xylème au phloème, sont distribués par les voies acropétale et basipétale (respectivement par le xylème et le phloème) (Wyss & Bolsinger, 1997). Des doses sublétales de néonicotinoïdes, tels que l'imidaclopride, le thiaméthoxame, le thiaclopride ou le dinotefurane utilisés en enrobage de grains de blé, réduisent significativement la durée de salivation dans le phloème et d'ingestion de sève phloémienne et xylémienne chez le puceron des épis des céréales *Sitobion avenae* (Aphididae) Fabricius (Miao *et al.*, 2014).

- **Vaporisation sur la plante :** Des pucerons verts du pêcher *M. persicae* déposés sur une plante préalablement traitée avec des extraits de feuille de Neem voient leurs durées totales de salivation dans le phloème et d'ingestion de sève élaborée réduites comparés aux pucerons déposés sur des plantes non traitées. Le temps d'accès au phloème est aussi augmenté avec le traitement préalable de la plante (Déla *et al.*, 2014). Les pucerons *M. persicae* sur des plants de moutarde de Chine (*Brassica juncea* Brassicaceae (L.) Czern.) traités au chitosan (polyoside composé de glucosamine obtenu par désacétylation de la chitine) montrent un retrait fréquent des stylets de la plante, ainsi qu'une durée plus importante d'activité des stylets dans le mésophylle comparés à des pucerons soumis à des plantes non traitées. Cependant, une fois que les stylets atteignent le tissu phloémien, aucune différence en termes de nombre ou de durée d'ingestion de sève phloémienne n'est observée (Salsabillah *et al.*, 2021). Le cycloxapride (un néonicotinoïde), au-delà de la réduction de la durée totale d'ingestion, réduit aussi le nombre de salivations et d'ingestions (soutenues ou non), ainsi que le pourcentage de l'activité totale des stylets attribué à la phase phloémienne d'*A. gossypii* sur les plants de coton *Gossypium sp.* (Yuan *et al.*, 2017). Dans l'étude de (Garzo *et al.*, 2020), les pucerons *M. persicae* sur des plants de tomates *S. lycopersicum* ayant reçu des traitements foliaires d'insecticides systémiques (sulfoxaflor, flonicamide, spirotetramat) montrent une fréquence et une durée plus élevées de déraillement des stylets que les pucerons sur des plantes non traitées. Samara *et al.* (2021) ont étudié l'effet du traitement de plants de pêcher avec neuf pesticides (Tableau 1) sur le comportement alimentaire de *M. persicae*. Le temps avant la première insertion des stylets dans la plante est réduit pour les pucerons sur les différentes plantes traitées comparés aux pucerons sur les plantes contrôles. Étonnamment dans cette étude, le temps avant la première ingestion de sève phloémienne est réduit pour les pucerons sur la plupart des plantes traitées avec les différents pesticides. Une dose sublétale de flonicamide appliquée sur la plante réduit significativement la durée de l'ingestion de sève élaborée dans le phloème de *M. persicae* sur chou champêtre (*B. rapa*) et d'*A. gossypii* sur concombre *Cucumis sativus* (Cucurbitaceae) L., tandis que des doses plus élevées de flonicamide peuvent provoquer la famine par inhibition de l'ingestion de sève élaborée dans le phloème.

Sur les mêmes modèles de pucerons/plantes, l'imidaclopride et le thiaméthoxame réduisent significativement la durée de l'ingestion de sève élaborée dans le phloème par les pucerons sur les plantes traitées (Cho *et al.*, 2011; Koo *et al.*, 2015). Les pesticides systémiques comme la pymétozine ont une activité systémique dans la plante en se transloquant dans le phloème suite à une vaporisation sur la surface de la feuille (Wyss & Bolsinger, 1997). L'ingestion de sève phloémienne est négativement impactée chez *A. fabae*, *A. gossypii*, *M. persicae* et le puceron vert et rose de la pomme de terre *Macrosiphum euphorbiae* (Aphididae) Thomas lorsque leur plante hôte reçoit une application foliaire de pymétozine ; de plus, on observe aussi chez *M. euphorbiae* et *M. persicae* une augmentation du temps avant la première ingestion de sève phloémienne (Harrewijn & Kayser, 1997).

Tableau 1 : Classification, modes d'action et activités des insecticides testés dans l'étude de Samara *et al.* (2021)

Insecticide (product)	Chemical class	Mode-of-action	Activity
λ-Cyhalothrin (Madator 120 EC*)	3 pyrethroid	Disrupts nerve sodium channel activation gate	Non-systemic contact and oral activity; some repellency
Acetamiprid (Assail 70 WP*)	4A neonicotinoid	CNS nicotinic acetylcholine receptor agonist	Contact and oral activity; systemic, translaminar
Flupyradifurone (Sivanto-200*)	4A neonicotinoid	CNS nicotinic acetylcholine receptor agonist	Contact and oral activity; systemic, translaminar
Sulfoxaflor (Closer 240 SC*)	4C neonicotinoid	CNS nicotinic acetylcholine receptor agonist	Contact and oral activity; systemic, translaminar
Pymetrozine (Endeavour 50 WG*)	9B pyridine azomethines	Acts on chordotonal mechanoreceptors (stretch receptors) to inhibit feeding	Contact and oral systemic activity against piercing-sucking insects
Fonicamid (Beleaf 50 SG*)	9C pyridinecarboxamide	Targets insect potassium A-type channel; rapidly inhibits feeding	Systemic, translaminar persistent oral activity
Tolenpyrad (Torac-15 EC*)	21A Pyrazole-5-carboxamide derivative	Mitochondrial respiration inhibitor	Foliar contact
Spirotetramat (Movento 245C*)	23 tetramic acid derivative (ketoenole)	Interferes with lipid biosynthesis.	Systemic, persistent foliar or root drench.
Cyantraniliprole (Cyazypyr 2005C*)	28 anthranilic diamide	Activates ryanodine receptor modulators	Systemic, translaminar broad spectrum activity

- **Expression dans la plante à l'aide du génie génétique :** Étonnamment, sur des plantes génétiquement modifiées pour synthétiser les protéines entomotoxiques Cry de *Bacillus thuringiensis* (Bacillaceae) Berliner, le temps avant la première insertion des stylets est réduit chez les pucerons *A. gossypii* comparés aux pucerons sur plantes non modifiées (Xue *et al.*, 2008). Un temps plus court avant la première insertion des stylets étant souvent associé aux plantes présentant une plus grande sensibilité aux pucerons, on pourrait donc supposer que les plantes génétiquement modifiées sont moins résistantes que les plantes non modifiées. Cependant, les pucerons *A. gossypii* ont une activité phloémienne réduite sur des plants de coton modifiés génétiquement pour synthétiser les protéines toxiques Cry de *B. thuringiensis* comparés à des pucerons sur plants de cotons non modifiés, malgré le fait qu'il ne soient pas la cible de ces molécules qui affectent plutôt les Lépidoptères ravageurs (Liu *et al.*, 2005).

- **Vaporisation sur les pucerons :** Suite à une exposition par contact topique avec des doses importantes de pymétozine, les pucerons *M. persicae* et *A. gossypii* retirent immédiatement leurs stylets du système vasculaire de la plante ou sont incapables d'insérer leurs stylets dans la plante (Harrewijn & Kayser, 1997). A plus faible dose, le temps avant la première insertion des stylets ainsi que le temps avant la première ingestion de sève phloémienne sont extrêmement retardés, et la durée d'ingestion de sève phloémienne est quant à elle extrêmement réduite.

I. 2. c. Résistance des plantes cultivées et impacts sur le comportement alimentaire

La recherche de résistance chez la plante cultivée s'appuie sur l'identification de défenses efficaces contre ses ravageurs. Deux grands types de défenses permettent aux plantes de contrer les insectes phytophages : les défenses constitutives sont exprimées en permanence par la plante, tandis que ses défenses induites sont activées notamment suite à une attaque de phytophages (War *et al.*, 2011c). Toutes les défenses, qu'elles soient constitutives ou induites, sont coûteuses pour la plante (Baldwin & Preston, 1999). Les réponses de défense mobilisent des ressources en carbone et en azote qui pourraient plutôt être allouées à la croissance végétative et à la reproduction. Ainsi un équilibre entre les réponses de défense constitutives et induites semble aboutir à la survie aux attaques immédiates et ultérieures sans pour autant impacter la fitness de la plante ou sa capacité de reproduction (Walling, 2000). Les défenses contre les phytophages peuvent être physiques (épaisseur de certains tissus, présence de trichomes, lignification des parois cellulaires) et/ou chimiques (alcaloïdes, terpénoïdes et composés phénoliques). Les molécules synthétisées qui participent aux défenses chimiques de la plante peuvent présenter des propriétés répulsives, antiappétantes, antidigestives et/ou toxiques (War *et al.*, 2011c).

Les réponses induites rendent, quant à elles, les plantes phénotypiquement plastiques et par conséquent diminuent les chances des ravageurs de s'adapter aux substances chimiques produites (Agrawal, 2011; Howe & Jander, 2008), ce qui peut affecter leur comportement et/ou leur fitness (War *et al.*, 2011a, 2011b). Une réponse induite précoce est bénéfique pour la plante, et améliore sa résistance vis-à-vis d'attaques ultérieures de ravageurs ou de pathogènes (Agrawal, 2011).

Les défenses des plantes vis-à-vis des pucerons s'expriment au niveau des différents tissus qui vont être pénétrés par les stylets.

- **La surface de la feuille est la première ligne de défense vis-à-vis des pucerons phloémophages.** Au niveau de la cuticule des stimuli mécaniques et/ou olfactifs peuvent affecter le comportement alimentaire des pucerons, et sont liés à la présence de trichomes, de substances volatiles répulsives, à la couleur ou la dureté de la surface de la feuille (van Helden & Tjallingii, 1993). Les exsudats de trichomes ou les cires épicuticulaires présents à la surface de la feuille peuvent par exemple retarder la première insertion des stylets dans

la plante (Lapointe & Tingey, 1984; Powell *et al.*, 1999). Certains métabolites secondaires comme les flavonoïdes sont naturellement synthétisés par les plantes (Peterson & Dwyer, 1998) et sont localisés dans les cellules de l'épiderme ainsi que dans les cires épicuticulaires et notamment dans les vacuoles de l'épiderme (Cuadra *et al.*, 1997; Takahama, 2004). Les lutéolines appartiennent à cette famille de molécules et ont des propriétés antiappétantes (Goławska & Łukasik, 2012). Observé grâce à l'EPG, un retard dans la première insertion des stylets dans la plante indique l'existence de facteurs de résistance au niveau de la surface de la feuille et de l'épiderme, comme cela a été identifié chez une variété résistante de pommier *Malus domestica* (Rosaceae) Borkh. (cv. Florina) (Marchetti *et al.*, 2009) ou chez la pomme de terre domestique *Solanum tuberosum* (Solanaceae) L. et d'autres espèces au sein du genre *Solanum* (Alvarez *et al.*, 2006).

- **Le mésophylle peut être un tissu qui entrave l'accessibilité au phloème et peut ainsi contribuer à la défense des plantes.** L'activité des stylets dans le mésophylle représente en général 60% de l'activité globale du comportement alimentaire des pucerons ; c'est donc un tissu qui joue un rôle important dans les défenses des plantes, qu'elles soient physiques ou chimiques. L'étroitesse de l'espace intercellulaire, ou l'épaisseur du mésophylle, entraîne une durée plus importante d'activité des stylets dans ce tissu. Par exemple, sur certains génotypes résistants de *Solanum sp.*, comparés à des génotypes sensibles, le nombre d'insertions des stylets avant la première activité phloémienne et la durée totale d'activité dans le mésophylle peuvent être augmentés (Alvarez *et al.*, 2006). Lors des potential drops (pds), les pucerons échantillonnent du contenu cellulaire et peuvent ainsi détecter des métabolites secondaires qui participent à leur prise de décision, notamment en terme d'initiation de leur reproduction (Tosh *et al.*, 2002). Certains métabolites de défense peuvent ainsi être détectés ou échantillonnés par les pucerons, ce qui peut par exemple engendrer un rejet de la plante. Le déraillement des stylets (onde F) peut être interprété comme une résistance mécanique à la progression des stylets dans la plante. Il a été observé que le nombre et la durée de cette phase peuvent être plus importants sur des variétés résistantes d'espèces de plantes cultivées (Marchetti *et al.*, 2009). Cette phase reste cependant difficile à interpréter dans le contexte de résistance des plantes. Les facteurs de résistance au niveau du mésophylle retardent l'accès au phloème, on déduit donc leur présence lorsque les pucerons ont un temps plus important jusqu'à la première salivation dans le phloème (onde E1) ou la première ingestion de sève phloémienne (onde E2). Ces facteurs de résistance dans le mésophylle ont été mis en évidence chez la pomme de terre domestique *S. tuberosum* et des espèces proches de *Solanum* (Alvarez *et al.*, 2006), chez une variété de tomate possédant le gène Mi-1.2 qui confère une résistance vis-à-vis des phytophages (Pallipparambil *et al.*, 2010) ou encore chez une variété résistante de soja *Glycine max* (Fabaceae) (L.) Merr. (Crompton & Ode, 2010). De plus, ce retard dans l'accès au phloème diminue l'efficacité de la prise alimentaire, exprimée en tant que rapport de la durée d'activité des stylets dans le mésophylle vis-à-vis de la durée d'ingestion de sève

élaborée. Plus l'activité dans le mésophylle est importante au détriment de l'activité dans le phloème, moins le puceron a un bénéfice énergétique.

- **Au niveau du tissu phloémien**, les mécanismes permettant une résistance localisée peuvent être physiques (occlusion du phloème) et/ou chimiques (présence de composés dissuasifs dans les tubes criblés) (Tjallingii, 2006; Le Roux *et al.*, 2008). L'épaisseur du phloème peut jouer un rôle de barrière physique. Chez certaines espèces d'Hémiptères phloémophages, comme le psylle asiatique des agrumes *Diaphorina citri* (Psyllidae) Kuwayama, il est possible d'observer une phase de percement du phloème (phase D) dont la durée peut varier (de l'ordre de plusieurs secondes) notamment en fonction de l'hôte du psylle (plante sensible *vs.* résistante), et en particulier de l'épaisseur du tissu phloémien (Bonani *et al.*, 2010). Cette phase est trop courte chez les pucerons pour pouvoir être étudiée, cependant il est possible d'envisager que des mécanismes équivalents puissent exister. Les plantes peuvent initier l'occlusion du phloème, ce qui permet d'éviter le prélèvement de sève par les pucerons. Cette occlusion implique deux processus, un développement relativement rapide de bouchons protéiques qui scellent transitoirement les tubes criblés du phloème, suivi d'un dépôt plus lent de callose qui assure l'occlusion à long terme des tubes criblés (Will & van Bel, 2006). Les forisomes sont un groupe de protéines présentes dans le phloème qui, en l'absence de perturbation, sont sous la forme d'« aiguilles » cristalloïdes compactes. En réponse à des dégâts localisés au niveau du phloème, un afflux d'ions Ca^{2+} provoque l'augmentation du volume des forisomes et leur dispersion en une conformation sphérique qui scelle les tubes criblés et empêche donc l'accès des pucerons à la sève phloémienne (Peters *et al.*, 2006). La salive des pucerons peut cependant provoquer l'inversion des forisomes de l'état dispersé vers l'état compact, et donc supprimer l'occlusion du phloème (Will *et al.*, 2007). Ainsi, une augmentation de la durée de salivation dans le phloème est classiquement observée sur les plantes résistantes (Sun *et al.*, 2018). Pour ce qui est des défenses chimiques au niveau du phloème, elles sont notamment dues à des composés antiappétants, qui sont des composés qui peuvent perturber l'alimentation des pucerons, via entre autres une réduction de l'activité globale des stylets ou de la prise de sève. Ces molécules sont souvent présentes de manière constitutive dans la sève, mais leur concentration peut augmenter de manière induite. La sensibilité d'une espèce donnée d'insecte phytophage dépend de la quantité et de la structure chimique des molécules antiappétantes auxquelles il est confronté (Klocke & Kubo, 1991). Bien que certaines molécules affectent principalement le comportement alimentaire, elles sont souvent aussi toxiques en cas d'ingestion. Les lectines sont des molécules très abondantes dans le phloème, qui semblent pouvoir entraîner une réduction de la durée d'ingestion de sève phloémienne (Gatehouse *et al.*, 1996; Sauvion, 1995; Zhang *et al.*, 2011), peut-être en interférant avec la digestion des pucerons au niveau de l'intestin moyen (Kehr, 2006). Ainsi, des plantes modifiées génétiquement pour avoir un taux de lectines plus important permettraient d'altérer l'activité des stylets des pucerons dans le phloème (Sauvion *et al.*,

2004). Les glucosinolates sont des métabolites secondaires de défenses, présents notamment dans la sève phloémienne. L'effet des glucosinolates des plantes hôtes sur le comportement alimentaire des pucerons est spécifique à chaque espèce de puceron et peut avoir des implications évolutives (Jhou *et al.*, 2021). L'effet des glucosinolates, étudié par l'EPG, semble parfois relever de la phagostimulation (Fenwick *et al.*, 1983), parfois de l'antiappétance (Nault & Styer, 1972; Gabrys & Tjallingii, 2002). Cette différence en terme d'impact sur le comportement alimentaire s'explique en fonction du spectre alimentaire de l'insecte exposé aux glucosinolates : ces composés sont appétants pour les pucerons inféodés aux Brassicaceae et antiappétants pour les autres. A l'inverse, les facteurs de facilitation au niveau de la sève phloémienne sont les concentrations en acides aminés (Klingauf, 1987; Nowak & Komor, 2010) et en sucrose (Mittler, 1967; Mittler & Dadd, 1964), qui sont phagostimulants. La présence de facteurs de résistance au niveau du phloème peut induire un retard avant la première ingestion de sève phloémienne. Ce type de résistance a été très étudié dans le cadre de la recherche d'amélioration variétale à l'aide de l'EPG chez la pomme de terre *S. tuberosum* ou le blé *T. aestivum* et des espèces sauvages proches (Alvarez *et al.*, 2006; Caillaud *et al.*, 1995), et chez des variétés résistantes de tomate *S. lycopersicum* (Pallipparambil *et al.*, 2010), de pommier *M. domestica* (Marchetti *et al.*, 2009), de soja *G. max* (Diaz-Montano *et al.*, 2007; Crompton & Ode, 2010) ou encore de melon *Cucumis melo* (Cucurbitaceae) L. (Klingler *et al.*, 1998). Cette résistance s'observe au niveau de l'EPG par une augmentation de la durée de salivation dans le phloème, une réduction de la durée ou du nombre d'ingestions de sève phloémienne, ou encore une absence d'ingestion soutenue de sève phloémienne (d'une durée supérieure à 10 minutes).

- Chez les pucerons, la consommation de **sève xylémienne** contribue à la régulation du potentiel osmotique élevé existant entre la sève élaborée et l'hémolymphe, la sève phloémienne étant très concentré en saccharose (Douglas, 2006; Pompon *et al.*, 2011). Au-delà de la régulation osmotique, une durée augmentée de la phase xylémienne peut être une conséquence d'une incapacité à ingérer de la sève phloémienne : à défaut de pouvoir s'alimenter, le puceron s'hydrate. En effet, la privation d'alimentation, *e.g.* 14h de famine, peut induire une augmentation de la phase d'ingestion de sève xylémienne (Ramirez & Niemeyer, 2000). Une augmentation de cette phase sur des variétés résistantes comparées à des variétés sensibles a été observée chez des pucerons du melon et du cotonnier *A. gossypii* sur le melon *C. melo* (Boissot *et al.*, 2000) ainsi que chez des pucerons du soja *Aphis glycines* (Aphididae) Matsumura sur soja *G. max* (Crompton & Ode, 2010). Aussi, des pucerons testés en EPG sur des plantes non-hôtes peuvent avoir une durée d'ingestion de sève xylémienne plus importante que la durée d'ingestion de sève phloémienne (Tjallingii, 1990).

1. 3. Leviers explorés au cours de la thèse au regard de la synthèse bibliographique

Nous avons vu que le comportement alimentaire est un élément important dans la colonisation des plantes hôtes par les Hémiptères phloémophages, et que plusieurs méthodes permettent dans le cadre de la protection des cultures de perturber ce comportement. Dans ce travail de thèse, nous souhaitons donc évaluer si l'efficacité de différentes méthodes de contrôle des Hémiptères phloémophages de vergers peut être expliquée par les modifications du comportement alimentaire qu'elles engendrent. Ceci amène deux questions : 1- dans quelle mesure la méthode de protection des cultures étudiée perturbe-t-elle le comportement alimentaire ? et 2- est-ce-que cette perturbation et ses conséquences sur la colonisation de la plante hôte pourraient permettre de contrôler le ravageur en vergers ? Pour certaines de ces méthodes de contrôle, nous avons aussi étudié leurs effets sur le troisième niveau trophique (parasitoïdes) afin d'évaluer si ces méthodes pouvaient impacter la régulation des Hémiptères phloémophages par les ennemis naturels.

Au regard des leviers agronomiques précédemment évoqués, dans ce projet de thèse nous avons fait le choix de nous restreindre aux trois leviers dont les effets seront étudiés dans les chapitres 3, 4 et 5 et présentés dans la Figure 8.

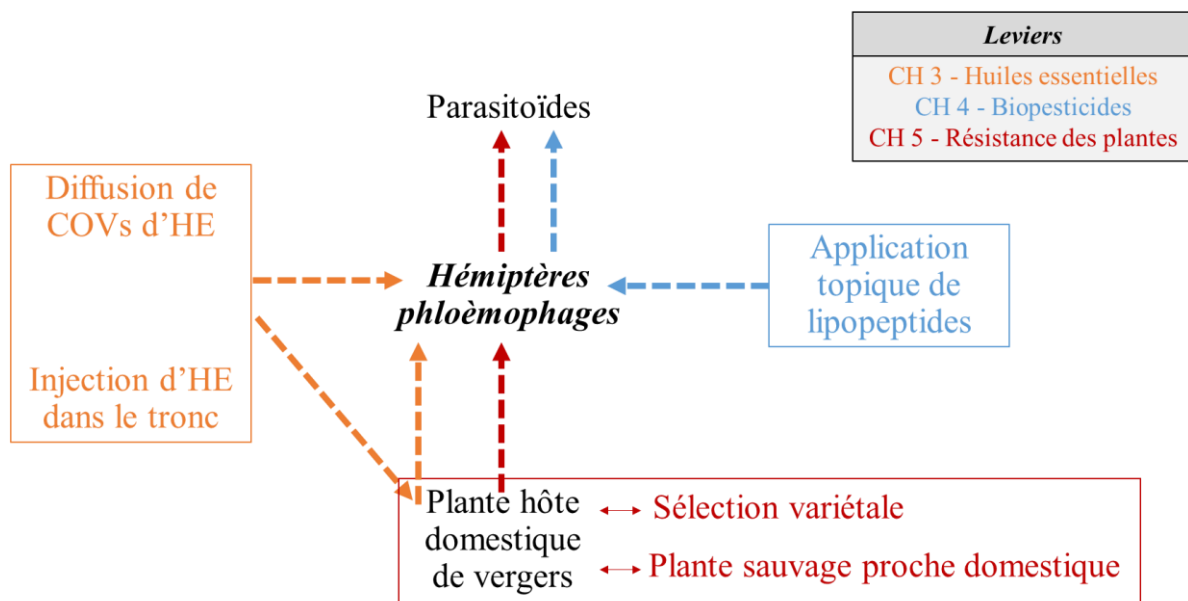


Figure 8 : Leviers étudiés permettant la régulation des Hémiptères phloémophages et répercussions éventuelles sur la lutte biologique via les auxiliaires

La Figure 9 présente les hypothèses quant aux composés ou mécanismes qui pourraient être impliqués dans la perturbation du comportement alimentaire supposée des leviers étudiés. Dans le chapitre 3, les Hémiptères seront confrontés aux composés exogènes à la plante hôte que

contiennent les huiles essentielles, selon deux modes d'exposition. Dans un premier cas, ces composés exogènes aux propriétés répulsives seront diffusés dans l'atmosphère, et dans le second cas, ces composés exogènes toxiques et/ou antiappétants sont injectés dans l'arbre de façon à ce qu'ils soient véhiculés par la sève. Dans les deux cas, ils sont susceptibles de perturber le comportement alimentaire des Hémiptères phloémophages. Les composés toxiques des lipopeptides, au-delà de la mortalité induite par l'application topique de ces biopesticides, peuvent être à l'origine d'effets sublétaux chez les survivants qui peuvent aboutir à une altération du comportement, notamment alimentaire : ceci sera étudié dans le chapitre 4. Enfin, la part de la résistance étudiée dans le chapitre 5 est liée aux défenses constitutives des plantes, qui peuvent être physiques ou chimiques, et présentes dans les différents tissus. La résistance constitutive des plantes est susceptible de perturber le comportement alimentaire des Hémiptères. Dans la plupart des études conduites dans cette thèse, la conséquence de l'altération du comportement alimentaire sur la fitness des ravageurs a également été étudiée. Les phytophages constituent la ressource consommée par les parasitoïdes et les prédateurs. Dans la mesure où la progéniture des parasitoïdes est confinée aux ressources fournies par un seul hôte phytophage (Bukovinszky *et al.*, 2012; Harvey & Gols, 2018), un hôte avec une fitness réduite peut impacter négativement la fitness du parasitoïde. Ainsi, dans une perspective agronomique, il est important d'étudier les potentiels effets bottom-up des techniques de protection des cultures sur les ennemis naturels via les ravageurs (chapitre 4 partie 2 et chapitre 5 partie 1).

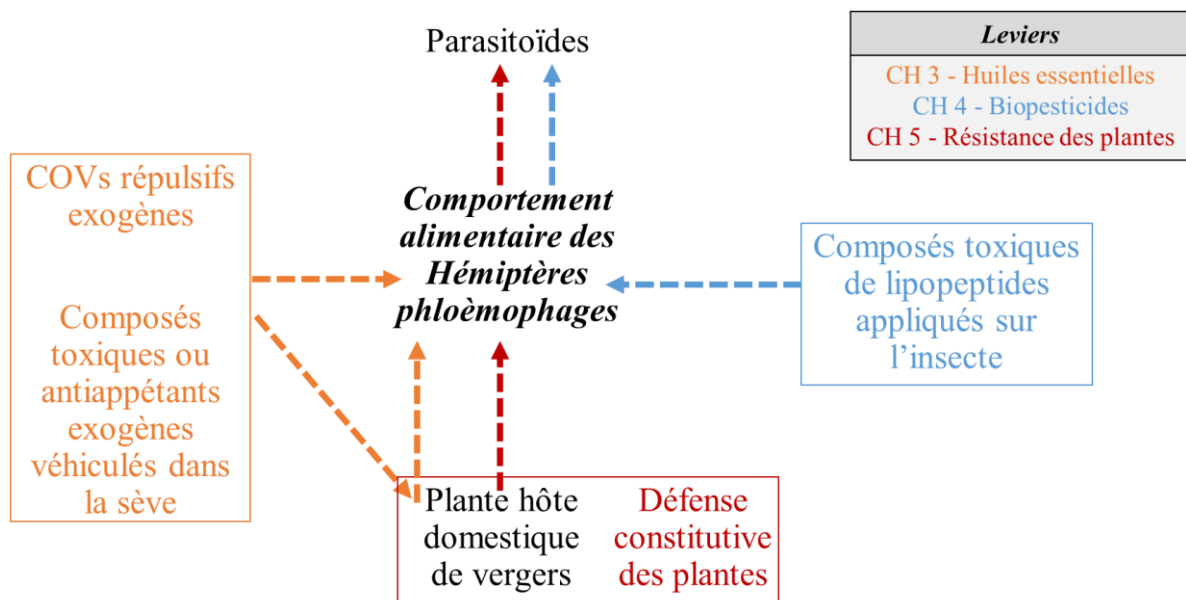


Figure 9 : Elements potentiellement responsables des effets perturbateurs supposés des leviers testés sur le comportement alimentaire des Hémiptères phloémophages et répercussions éventuelles sur la lutte biologique via les auxiliaires

Chapitre 2. Matériels et Méthodes expérimentales

II. 1. Modèles biologiques

II. 1. a. Les plantes hôtes

Les pommiers du genre Malus, Malus domestica et Malus sylvestris

Le cultivar Jonagold du pommier domestique *M. domestica* a été utilisé en tant que plante hôte pour l'élevage du puceron cendré du pommier *Dysaphis plantaginea* (Aphididae) Passerini dans l'ensemble des travaux conduits durant la thèse, du fait de sa sensibilité vis-à-vis de cette espèce (Arnaoudov & Kutinkova, 2006). Les plants étaient fournis par le Centre Wallon de Recherches Agronomiques (CRA-W) (Gembloux, Belgique) et obtenus à partir de multiplication *in vitro*. A la réception les vitroplants mesuraient 2 à 5 cm et présentaient 2 à 4 feuilles. Les vitroplants étaient replantés par trois dans des pots de 90 × 90 × 70 mm, contenant du terreau commercial stérilisé (Botanic, référence : 386895). Les plants étaient utilisés après leur acclimatation et leur croissance qui duraient 6 ± 2 semaines. Au moment de leur utilisation, les plants mesuraient en moyenne 15 ± 5 cm et présentaient 16 ± 4 feuilles. Pour le maintien des élevages des pucerons, des pots (90 × 90 × 70 mm) contenant trois plants étaient placés dans une cage cubique ventilée en plexiglas (50 cm).

Les plants de Jonagold étaient utilisés pour les élevages, la synchronisation de cohortes de pucerons *D. plantaginea* pour la réalisation des expériences (détaillée dans la partie dédiée) et comme plante hôte de référence dans toutes les expériences pour lesquelles la variable d'études n'était pas la plante hôte des phytophages (chapitres 3 et 4). Dans ces cas, les vitroplants ont été individualisés dans des pots de 60 × 60 × 70 mm.

Dans le chapitre 5 partie 1, l'étude de l'effet bottom-up de trois variétés de pommiers aux résistances contrastées sur *D. plantaginea* et un parasitoïde a été réalisée. Les variétés sélectionnées étaient Gala, Ariane et Greensleeves. Gala est un cultivar considéré comme sensible aux pucerons (Miñarro & Dapena, 2007), alors qu'Ariane et Green Sleeves sont potentiellement résistants aux pucerons. En effet, la variété Ariane est résistante à la tavelure, et cette résistance est communément associée à la résistance à *D. plantaginea*, et Greensleeves étant résistante au feu bactérien, nous avons supposé qu'elle pouvait être résistante à *D. plantaginea* (Chevreau *et al.*, 1998; Laurens *et al.*, 2005). Les plants étaient reçus à l'état de vitroplants, et fournis par l'entreprise Vegepolys (Angers, France). Une fois réceptionnés, les plants étaient repiqués individuellement dans des pots de 60 × 60 × 70 mm contenant du terreau stérilisé (identique à celui utilisé pour les plants de pommier Jonagold).

Dans le chapitre 5 partie 2, le lien entre la structure génétique du pommier sauvage européen *Malus sylvestris* (Rosaceae) (L.) Mill. et le comportement alimentaire et de *D. plantaginea* a été étudié. Les plants de *M. sylvestris* utilisés dans l'étude ont été cultivés à partir de graines collectées sur le terrain (Chen *et al.*, 2022). Ces graines de pommiers sauvages provenaient de trois des cinq populations européennes de pommiers sauvages décrites dans Cornille *et al.*

(2015) : les populations danoises, françaises et roumaines. Chaque population était représentée par un seul site d'échantillonnage, et dans chaque site, chaque graine a été échantillonnée sur un arbre unique, de sorte que chaque plant avait une origine parentale différente. L'espèce *M. domestica* a aussi été utilisée comme référence dans cette étude, pour laquelle des plants résultant de croisements entre diverses variétés de *M. domestica* ont été utilisés. Les graines issues de ces croisements ont été aimablement fournies par l'INRAE IRHS d'Angers qui réalise chaque année des croisements dans le cadre de ses programmes de sélection de pommiers. Après l'échantillonnage sur le terrain, les graines ont été stockées à -20 °C avant d'être vernalisées pour l'expérience, pendant trois mois à 4 °C dans l'obscurité, puis cultivées en conditions contrôlées (température $22 \pm 1^\circ\text{C}$; $60 \pm 5\%$ d'humidité relative (RH) ; photophase de 16 h, 50 ± 10 PPF) pendant deux mois avant d'être transférées individuellement dans des pots de 3 L contenant du terreau commercial stérilisé (identique à celui utilisé pour les plants de pommier Jonagold). Au moment de leur utilisation pour les expériences deux mois plus tard, les plants âgés de quatre mois après germination mesuraient en moyenne 65 ± 15 cm et présentaient environ une quarantaine de feuilles.

Les différentes espèces et variétés de pommiers ont été maintenues jusqu'à leur utilisation pour les élevages ou les expériences en chambre climatisée dans des conditions contrôlées (température $20 \pm 1^\circ\text{C}$; $60 \pm 5\%$ d'humidité relative (RH) ; photophase de 16 h, 35 PPF).

L'ensemble des plants utilisés pour les élevages comme pour les expériences n'ont pas fait l'objet de greffe sur un porte-greffe.

Le poirier *Pyrus communis*

Le cultivar Durondeau du poirier *Pyrus communis* (Rosaceae) L. a été utilisé en tant que plante hôte dans le cadre des travaux, car ce cultivar est sensible au psylle du poirier *Cacopsylla pyri* (Psyllidae) Linnaeus (Quarta & Puggioni, 1985). Les plants étaient fournis par le Centre Wallon de Recherche Agronomique (CRA-W) (Gembloux, Belgique) et obtenus à partir de multiplication *in vitro*. A la réception les vitroplants mesuraient 2 à 5 cm et avaient 2 à 4 feuilles. Les vitroplants étaient replantés par trois dans des pots de $90 \times 90 \times 70$ mm, contenant du terreau commercial stérilisé (Botanic, référence : 386895). Les plants du cultivar Durondeau ont été utilisés pour les élevages et les synchronisations des psylles, ainsi que pour les expériences. Après leur acclimatation et croissance qui duraient 10 ± 2 semaines, les plants mesuraient 10 ± 5 cm et avaient 12 ± 4 feuilles. Avant leur utilisation, les plants ont été individualisés dans des pots de $60 \times 60 \times 70$ mm.

L'ensemble des plants utilisés pour les élevages comme pour les expériences n'ont pas fait l'objet de greffe sur un porte-greffe.

II. 1. b. Les Hémiptères phloémophages

Les pucerons inféodés au pommier

L'essentiel de cette thèse a porté sur le puceron cendré du pommier *D. plantaginea*. C'est le principal puceron ravageur du pommier ; d'autres pucerons ravageurs se développent fréquemment sur les pommiers tels que le puceron lanigère du pommier *E. lanigerum* sur le tronc ou le puceron vert du pommier *Aphis pomi* (Aphididae) De Geer et le puceron des galles rouges *Dysaphis devectora* (Aphididae) Walker qui créent des colonies sur les feuilles. Au-delà de ce cortège classiquement associé aux pommiers, une vingtaine d'autres espèces ont été répertoriées sur cette plante (Blackman & Eastop, 2000). Parmi celles-ci, on trouve des pucerons polyphages, ravageurs secondaires, qui peuvent utiliser les pommiers comme hôte à l'instar du puceron vert et rose de la pomme de terre *M. euphorbiae*, du puceron vert du pêcher *M. persicae*, du puceron du melon et du cotonnier *A. gossypii* ou encore du puceron noir de la fève *A. fabae*. Ce dernier a également été utilisé dans le chapitre 4 partie 2 de cette thèse, dans le travail visant à déterminer les effets des lipopeptides sur les pucerons et sur le comportement de sélection de l'hôte par les femelles parasitoïdes.

Le puceron cendré du pommier *Dysaphis plantaginea*

Le puceron cendré du pommier *D. plantaginea* est une espèce diécique qui nécessite deux plantes hôtes de familles botaniques différentes pour accomplir tout son cycle : son hôte primaire est *M. domestica* (Rosaceae), et son hôte secondaire semble être le plantain lancéolé *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae) L. (Blackman & Eastop, 2000).

Au début de leur développement sur les feuilles de l'hôte primaire qu'est le pommier, les larves de *D. plantaginea* sont beiges puis deviennent gris-brun en passant par la couleur rose. Sur pommiers, l'adulte aptère est de forme globuleuse (1,8 à 2,4 mm de longueur), vert olive foncé ou rose vineux, recouvert d'une fine pulvérulence blanche à grisâtre, d'où son nom de puceron cendré du pommier ("Encyclop'Aphid : l'encyclopédie des pucerons - *D. plantaginea*," n.d.). Sur plantain, les adultes ont une forme plus allongée, et sont de couleur brunâtre. Le puceron *D. plantaginea* est une espèce holocyclique, qui a gardé la possibilité d'effectuer un cycle biologique complet avec des femelles fondatrices se reproduisant par parthénogenèse et des femelles ovipares se reproduisant suite à un accouplement avec des mâles (pour un détail du cycle de vie, voir la Figure 10).

La population de *D. plantaginea* utilisée dans la majorité des études conduites dans ce travail (chapitre 3 partie 1, chapitre 4 partie 1 et chapitre 5 partie 1 et 2) a été échantillonnée au printemps 2018 sur un pommier du verger d'Agrocampus Ouest et aimablement fournie par l'INRAE (Angers, France). La population de *D. plantaginea* utilisée dans l'étude du chapitre 3 partie 2 a quant à elle été initiée à partir de pucerons collectés en 2018 dans les vergers expérimentaux du Proefcentrum voor Fruitteelt, Sint-Truiden, Belgique.

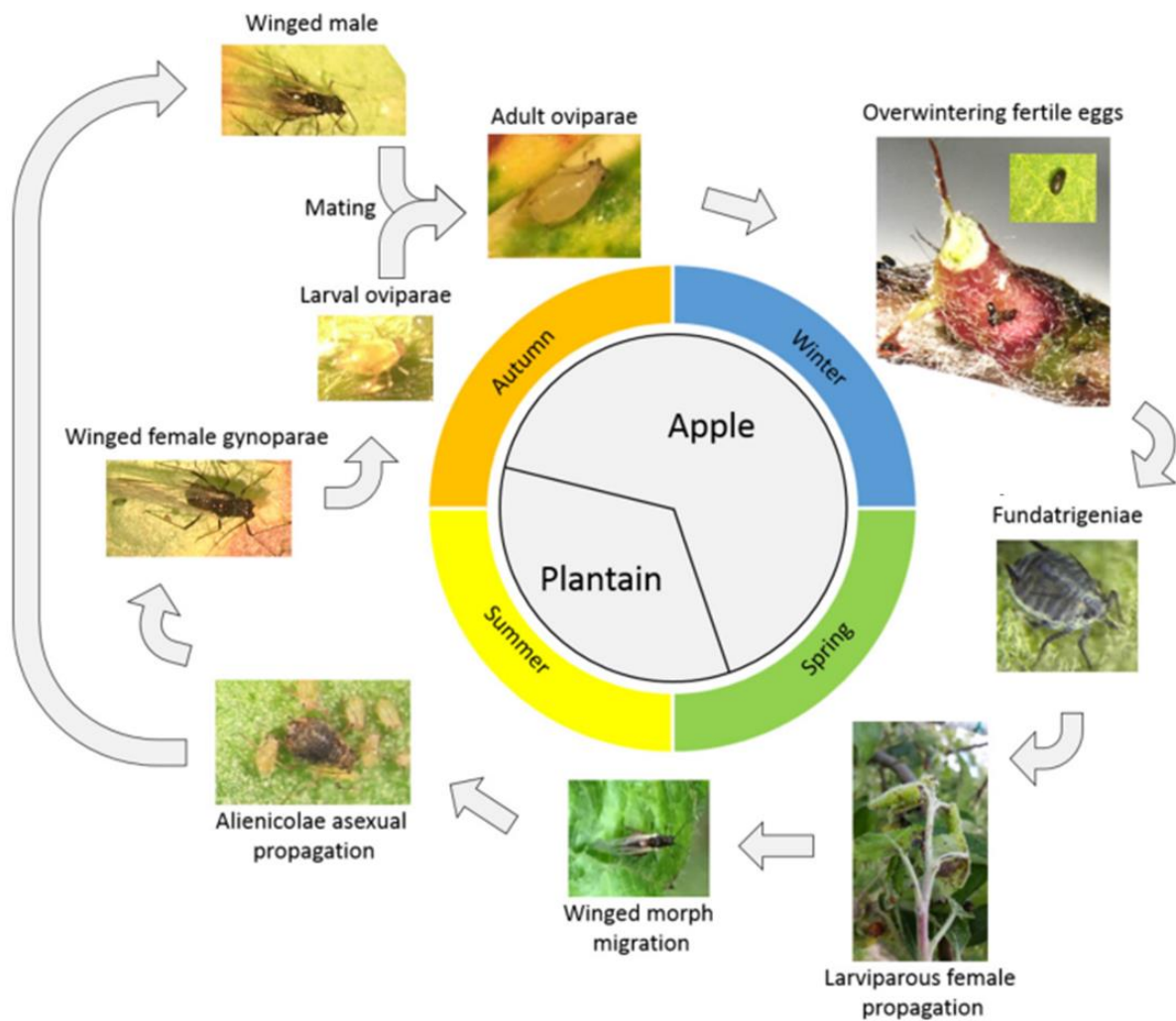


Figure 10 : Cycle de vie de *D. plantaginea* (Warneys et al., 2018)

Le puceron noir de la fève Aphis fabae

Le puceron noir de la fève *A. fabae* est une espèce généralement holocyclique diécique, mais qui peut être anholocyclique (multiplication par parthénogenèse toute l'année) dans les régions à climat doux. C'est une espèce très polyphage : plus de 200 plantes sont considérées comme hôtes pour ce puceron. Les deux hôtes primaires d'*A. fabae* sont le fusain *Euonymus europaeus* (Celastraceae) L. et la viorne obier *Viburnum opulus* (Adoxaceae) L. ; ses hôtes secondaires couvrent de nombreux taxons tels que les Fabaceae, Chenopodiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Solanaceae, Rosaceae (dont le pommier), etc. L'adulte aptère est trapu, noir mat à verdâtre et mesure 1,5 à 2,6 mm ("Encyclop'Aphid : l'encyclopédie des pucerons - *A. fabae*," n.d.).

La colonie d'*A. fabae* (utilisée dans le chapitre 4, partie 2) a été initiée à partir d'une seule femelle parthénogénétique aptère fournie en 2018 par l'UCL (Louvain, Belgique) et a été maintenue sur fève (V. *faba* var. Axel).

Les différentes espèces de pucerons utilisées ont été élevées en chambre climatisée dans des conditions contrôlées identiques à celles utilisées pour les plantes. Les élevages étaient maintenus dans des boîtes en Plexiglas® ventilées (36 x 24 x 11 cm).

Le psylle du poirier *Cacopsylla pyri*

Les psylles du poirier font partie des insectes ravageurs les plus importants du poirier ; trois espèces principales – *Cacopsylla pyri*, *Cacopsylla pyricola* Foerster et *Cacopsylla bidens* (Psyllidae) Šulc - sont responsables de la majorité des dégâts occasionnés par les psylles sur les poiriers. Elles sont principalement répandues en Europe, en Amérique du Nord et au Moyen-Orient. Le cycle de développement de *C. pyri* est représenté sur la Figure 11 ; il s'effectue dans son ensemble sur le poirier, et l'hivernation est réalisée par les adultes. Les larves passent par cinq stades, les plus jeunes étant presque entièrement enveloppés de miellat. Après la dernière mue, les larves se transforment en adultes mâles ou femelles, qui sont capables de se reproduire sexuellement en quelques jours (Hodkinson, 2009). En fonction de la durée de la saison et du climat, *C. pyri* peut avoir trois à quatre générations par an.

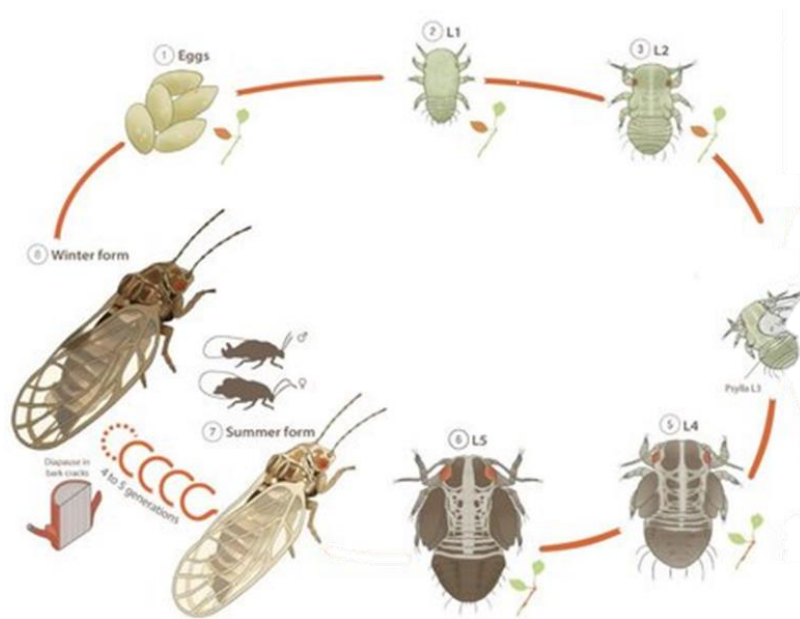


Figure 11 : Cycle de *C. pyri* (Tougeron et al., 2021)

La population de *C. pyri* (utilisée dans le chapitre 3, partie 1 et 2) a été initialement collectée en 2013 dans le verger expérimental de poiriers du Proefcentrum voor Fruitteelt, Sint-Truiden, Belgique.

Les psylles ont été élevées en chambre climatisée dans des conditions contrôlées identiques à celles utilisées pour les plantes. L'élevage était maintenu dans des boîtes en Plexiglas® ventilées (36 x 24 x 11 cm).

*II. 1. c. Les parasitoïdes de pucerons : *Aphidius matricariae* et *Ephedrus cerasicola**

Les Hyménoptères *Aphidius matricariae* (Braconidea) Haliday et *Ephedrus cerasicola* (Braconidea) Stary sont deux espèces de parasitoïdes de pucerons. Ce sont des endoparasitoïdes solitaires, c'est-à-dire qu'une seule larve se développe à l'intérieur du puceron-hôte. Ils sont koïnobiontes, c'est-à-dire que leur hôte continue à se développer après l'oviposition du parasitoïde. Ces deux espèces sont connues pour parasiter et se développer avec succès dans *D. plantaginea* (Hullé *et al.*, 2020). Un cocktail de ces deux espèces de parasitoïdes a d'ailleurs été développé pour contrôler *D. plantaginea* en vergers de pommiers (Tougeron *et al.*, 2022).

Les parasitoïdes des deux espèces *A. matricariae* et *E. cerasicola* ont été gracieusement fournis par VIRIDAXIS (Gosselie, Belgique). Les parasitoïdes étaient réceptionnés sous forme de momies et individuellement transférés dans des tubes en plastique (7,5 x 1,3 cm) bouchés par un morceau de coton. Après émergence, les parasitoïdes étaient sexés et l'accouplement permis en regroupant deux mâles pour trois femelles dans le même tube. Les parasitoïdes étaient nourris *ad libitum* avec une solution 1 : 1 eau : miel (volume/volume) jusqu'à leur utilisation pour les expériences 4 ± 1 jours post-émergence. Ils étaient maintenus dans une enceinte climatisée (Panasonic, Versatile Environmental Test Chamber MLR-352H, 294 L) dans des conditions contrôlées (température 20 ± 1°C ; 60 ± 5 % d'humidité relative (RH) ; photophase de 16 h et 35 PPFD).

II. 2. : Méthodes expérimentales

Les méthodes expérimentales utilisées dans les différents chapitres de la thèse seront présentées de manière exhaustive dans cette section. Le Tableau 2 ci-dessous dresse l'inventaire des méthodes utilisées, répertoriées par étude.

Tableau 2 : Détail du matériel biologique et des paramètres étudiés, déclinés par chapitre

	Plantes étudiées	Modèles d'insectes	Comportement du phytophage	Traits d'histoire de vie du phytophage	Parasitoïde
Chapitre 3. Les huiles essentielles : des perturbateurs du comportement des Hémiptères					
Partie 1 : Diffusion d'huile essentielle d'ail	<i>M. domestica</i> (cv. Jonagold) <i>P. communis</i> (cv. Durondeau)	<i>D. plantaginea</i> <i>C. pyri</i>	Comportement alimentaire (EPG), Locomotion (test de choix)		
Partie 2 : Injection d'huile essentielle de cannelle dans le tronc	<i>M. domestica</i> (cv. Jonagold) <i>P. communis</i> (cv. Durondeau)	<i>D. plantaginea</i> <i>C. pyri</i>	Comportement alimentaire (EPG)	Masse, Survie	
Chapitre 4. Perturbation par les biopesticides : exemple des lipopeptides					
Partie 1 : Effets des lipopeptides sur les pucerons	<i>M. domestica</i> (cv. Jonagold)	<i>D. plantaginea</i>	Comportement alimentaire (EPG), Locomotion (vélocité, dispersion)	Mortalité (à 1h et 24h)	
Partie 2 : Effets des Surfactines sur les pucerons et conséquence sur la sélection de l'hôte par les femelles parasitoïdes	<i>V. faba</i> (cv. Axel)	<i>A. fabae</i> <i>A. matricariae</i>	Comportement alimentaire (EPG), Locomotion (vélocité, dispersion)	Mortalité (à 1h et 24h)	Comportement de choix d'hôte
Chapitre 5. Perturbations comportementales à travers la résistance des plantes et conséquences sur les interactions multitrophiques					
Partie 1 : Effet bottom-up de la résistance variétale du pommier domestique sur les pucerons et les parasitoïdes	<i>M. domestica</i> (cv. Gala, Ariane, Green Sleeves)	<i>D. plantaginea</i> <i>E. cerasicola</i>	Comportement alimentaire (EPG)	Masse, Taux de lipides, Période pré-reproductive	Durée de développement, Sex-ratio, Taille des tibias, Charge en œufs
Partie 2 : Lien entre structure génétique des populations de pommiers sauvages et comportement alimentaire des pucerons	<i>M. domestica</i> (croisement de variétés) <i>M. sylvestris</i> (3 populations : danoise, française, roumaine)	<i>D. plantaginea</i>	Comportement alimentaire (EPG)	Masse, Survie, Fécondité	

II. 2. a. Etudes physiologiques et morphométriques

Synchronisation des pucerons

Des cohortes de pucerons d'âges connus étaient utilisées pour toutes les expériences. Des larves d'âge connu et synchronisées ont été obtenues en plaçant des femelles adultes parthénogénétiques pendant 24 heures sur des plantes d'élevage avant de les retirer. Les larves étaient ensuite laissées en développement jusqu'à leur utilisation pour les expériences soit au troisième stade larvaire dans le cadre des expériences les impliquant en tant qu'hôtes pour les parasitoïdes, soit en tant que jeunes adultes pour toutes les autres expériences (pucerons âgés de 4 et 10 jours, respectivement).

Suivis des pucerons en « clip-cages » et mesure de leurs traits d'histoire de vie

Pour ce qui est de l'étude de la Période Pré-Reproductive (PRP ; durée entre le moment où un individu est larvposé et l'initiation de sa reproduction), des pucerons adultes prélevés de l'élevage de masse étaient placés pendant 24h sur les plantes hôtes étudiées (*i.e.* les trois différents cultivars utilisés dans l'étude du chapitre 5, partie 1), et les larves néonates ainsi produites étaient ensuite isolées en « clip-cage » au bout de 3-4 jours. Les observations étaient menées toutes les 24 h jusqu'à ce que les pucerons larvposent à leur tour, étant ainsi considérés comme ayant atteint le stade adulte. Les « clip cages » ont été construites en utilisant un cylindre en acrylique transparent (15 mm de diamètre, 8 mm de profondeur) couvert sur le dessus par une gaze en nylon (Figure 12). Du feutre a été utilisé comme barrière physique entre le cylindre et la surface de la feuille. Le cylindre était fermé par un disque en plastique de 20 mm de diamètre. Le cylindre et le disque étaient tenus ensemble par une pince cosmétique Mezzo®.

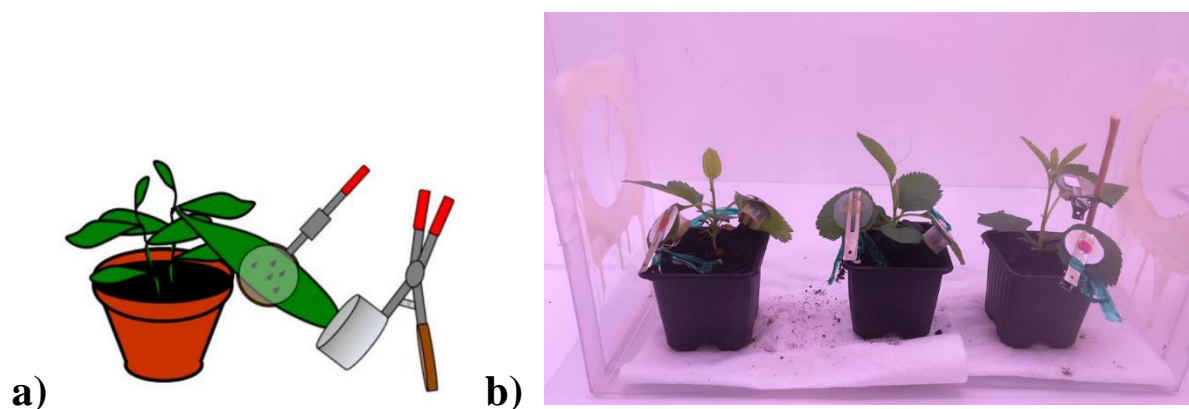


Figure 12 : a) Schéma (Chesnais, 2016) et b) photographie d'un dispositif de suivi des pucerons en « clip-cage »

La survie et la fécondité de pucerons adultes d'âges connus (10 ± 1 jours), maintenus individuellement sur leur plante hôte à l'aide d'une clip-cage, ont été mesurées sur une période

équivalente à celle de leur période PRP (Le Roux *et al.*, 2004), soit 10 jours pour *D. plantaginea*. Ces expériences ont été effectuées dans une salle climatisée en conditions contrôlées ($20 \pm 1^\circ \text{C}$ et $60 \pm 5\%$ d'humidité relative en photophase 16:8 L:D). Cette méthodologie a été utilisée dans le chapitre 5, partie 2. Dans le chapitre 3, partie 2, cinq individus de *D. plantaginea* ou cinq individus de *C. pyri* étaient groupés dans une même clip-cage où leur survie a été suivie sur dix jours consécutifs.

Dans le chapitre 4, la mortalité des pucerons exposés à des lipopeptides a été évaluée à 1h et 24h post-exposition. Le pourcentage de mortalité à 1 h (défini ici comme la mortalité survenant dans l'heure qui suit l'exposition) a été évalué comme le nombre de pucerons morts divisé par le nombre de pucerons traités. Les pucerons étaient ensuite transférés soit sur un milieu artificiel (Febvay *et al.*, 1988; Down *et al.*, 1996) pour *D. plantaginea*, ou sur une boîte de Petri contenant une feuille de *V. faba* sur gélose pour *A. fabae*. A 24 heures après l'application topique, le pourcentage de mortalité a été calculé comme le nombre total de pucerons morts (nombre de pucerons enregistrés morts à la fois à 1 heure et 24 heures après l'exposition) divisé par le nombre total de pucerons initialement traités.

Dans le chapitre 3, partie 2 et dans le chapitre 5, partie 1, les masses individuelles des pucerons et des psylles, préalablement conservés à -20°C , ont été déterminées à l'aide d'une microbalance de précision Mettler Toledo MT5 (Max : 3g, mini : mini = 1 μg , d = 1 μg). Dans le chapitre 5, partie 2, la masse des pucerons, préalablement conservés à -80°C , a été mesurée grâce à une microbalance de précision Mettler Toledo M3 (class1, Max : 3 g, mini = 1 μg , d = 1 μg).

Mesure des traits d'histoire de vie des parasitoïdes

Dans le chapitre 5, partie 1, la durée de développement, la taille des tibias, le sex-ratio et la charge en œufs des parasitoïdes ont été mesurés.

Trois femelles et deux mâles étaient relâchés dans une cage pop-up (30 x 30 x 30 cm ; Vermandel, Pays-Bas) contenant une plante sur laquelle étaient présentes 25 à 40 larves de *D. plantaginea* âgées de 4 jours. Ces parasitoïdes parentaux étaient laissés 48h dans la cage, puis étaient retirés. Les larves hôtes étaient observées toutes les 24 h et une fois que les momies commençaient à se former, ces dernières étaient retirées de la plante et isolées individuellement dans des tubes en plastique (7,5 x 1,3 cm) bouchés par un morceau de coton. Les momies isolées étaient ensuite observées toutes les 24 heures jusqu'à émergence de l'adulte ; le sexe de l'individu était relevé et la durée de son développement était alors calculée comme la durée écoulée entre le lâcher des parasitoïdes parentaux et l'émergence du descendant adulte.

Le jour de l'émergence, les parasitoïdes mâles étaient conservés individuellement dans un congélateur à -80°C . Les femelles émergées étaient placées individuellement dans un tube plastique (7,5 x 1,3 cm) pendant 48h en condition contrôlée ($20 \pm 1^\circ \text{C}$ et $60 \pm 5\%$ d'humidité relative en photophase 16:8 L:D) avec une boule de coton imbibée du mélange eau/miel pour les nourrir, afin de les laisser développer leur stock d'œufs avant de les placer individuellement

dans un congélateur à -80°C. La taille du tibia des parasitoïdes (Chesnais *et al.*, 2015) a été mesurée sous stéréomicroscope (LEICA M165 C) équipé d'un oculaire micrométrique (x 10). Les femelles étaient placées dans une goutte de NaCl (9‰), les ovaires étaient retirés de l'abdomen et disséqués afin de les vider de leurs œufs, qui étaient ensuite comptés sous un stéréomicroscope (LEICA M165 C) équipé d'un oculaire micrométrique (x 10). La charge en œufs de chaque femelle était exprimée en nombre total d'œufs matures contenus dans l'ensemble de ses deux ovaires.

II. 2. b. Etudes comportementales sur les insectes

Comportement de locomotion - Tests de choix

Le comportement de locomotion des pucerons et des psylles, en terme de choix entre différentes sources (plante hôte, huile essentielle, etc. ; chapitre 3, partie 1) a été testé dans un dispositif permettant des stimuli de contact, olfactifs et visuels, selon un protocole adapté de Baudry *et al.* (2021) (Figure 13).

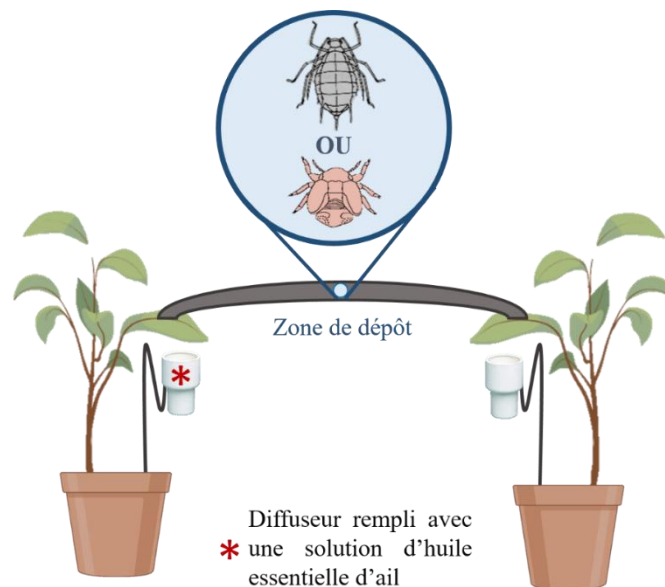


Figure 13 : Représentation schématique du dispositif d'étude du choix des pucerons ou des psylles

Ce dispositif consistait en un pont en plastique noir (12 × 2 cm) permettant à l'insecte de se déplacer entre deux sources comprenant soit une feuille supérieure de la plante hôte, soit un diffuseur en caoutchouc seul, soit une combinaison des deux. Chaque diffuseur était suspendu à l'aide d'un fil de fer inséré dans le substrat du pot, à une hauteur correspondant à celle des feuilles supérieures (c'est-à-dire 5-10 cm) et situé à 2 cm de la feuille placée à proximité du pont en plastique. Un seul Hémiptère a été placé au milieu du pont reliant les deux sources pour

chaque test. Chaque individu a été observé pendant 5 min ou jusqu'à ce qu'il ait fait un choix (c'est-à-dire le contact avec la feuille de la plante hôte placée à proximité du pont en plastique ou l'atteinte d'une extrémité de ce dernier si la source testée ne comportait pas de plante hôte). Le temps de latence entre le dépôt de chaque insecte sur le pont et le choix effectué a également été enregistré. Les insectes ne répondant pas ont été comptés (c'est-à-dire ceux qui n'avaient pas fait de choix dans les 5 minutes de l'expérience). Pour minimiser les stimuli externes, les parois du dispositif étaient recouvertes de papier blanc. Les sources testées ont été placées au hasard afin d'éviter tout biais potentiellement dû à l'effet de leur position.

Comportement de locomotion - Vitesse, dispersion

Afin d'étudier l'effet subléthal de l'exposition aux lipopeptides sur le comportement locomoteur des pucerons (chapitre 4, parties 1 et 2), le comportement de dispersion et la vitesse des pucerons pré-exposés aux lipopeptides ont été suivis sur une arène cible selon la méthodologie de Chesnais *et al.* (2020). Un seul puceron a été déposé au centre d'une arène expérimentale (285 mm de diamètre), divisée en dix cercles concentriques ("zones spatiales") distants de 15 mm. Chaque puceron était déposé sur une plaque de verre transparente placée sur l'arène, ce qui permettait de nettoyer la surface du verre avec de l'éthanol puis de l'eau tous les cinq enregistrements. Afin de minimiser les stimuli externes, l'arène a été placée entre quatre "murs" en « carton plume » (45 cm de haut, 5 mm d'épaisseur). Pour chaque puceron, le temps mis pour traverser une zone spatiale particulière pendant un maximum de 300 s (paramètre "vitesse") et la zone maximale atteinte (paramètre "dispersion") ont été déterminés. Le test était terminé (i) si le puceron traversait la 10^{ème} zone spatiale et quittait l'arène, ou (ii) à la fin des 300 s. Tous les pucerons restant dans le cercle d'introduction pendant la totalité des 300 s étaient considérés comme "non-répondants".

Comportements alimentaires des pucerons et des psylles

Une photographie du dispositif d'électropénétrographie utilisé pour toutes les expériences est présentée Figure 14. Une électrode constituée d'un fil de cuivre de 2 cm de long soudé à la tête d'un clou en laiton de 2,2 mm de diamètre a été utilisée pour câbler les insectes. L'autre extrémité de l'électrode était constituée d'un mince fil d'or de 20 µm de diamètre et de 2 cm de long collé à la partie fil de cuivre de l'électrode. Une gouttelette de colle d'argent conductrice à base d'eau a été utilisée pour fixer le fil d'or au fil de cuivre de l'électrode et une autre a été déposée sur l'abdomen des pucerons pour les fixer à l'extrémité du fil d'or avec de la colle d'argent (toutes deux fournies par EPG Systems). Huit pucerons ont été connectés individuellement au boîtier d'amplification DC-EPG Giga-8 (EPG Systems), chacun étant placé sur la face abaxiale d'une feuille de leur plante hôte respective. Les enregistrements ont été effectués en continu pendant 8 h au cours de la photophase à l'intérieur d'une cage de Faraday, dans des conditions contrôlées ($20 \pm 1^\circ \text{C}$ et $60 \pm 5\%$ d'humidité relative en photophase 16:8

L:D). Les données EPG ont été numérisées à l'aide d'une carte analogique-numérique DatQ Instruments DI-710-UH et enregistrées avec le logiciel Stylet + (EPG Systems), à une fréquence d'échantillonnage de 100 Hz, des impédances d'entrée (R_i) de 10^9 ohms (Ω) et en courant continu. L'analyse des formes d'onde EPG a été réalisée à l'aide du logiciel Stylet +. Les paramètres des formes d'onde enregistrées ont été calculés avec le logiciel EPG-Calc version 6.1.7.



Figure 14 : Photographie du dispositif EPG, système *Malus domestica*/*Dysaphis plantaginea*

Comportement de sélection de l'hôte par les parasitoïdes

Afin d'évaluer si les femelles d'*A. matricariae* seraient capables de discriminer entre les pucerons exposés aux Surfactines et ceux non-exposés (chapitre 4, partie 2), une femelle *A. matricariae* standardisée (émergée depuis trois jours, et mise en présence de deux mâles pendant deux jours pour garantir un accouplement) a été introduite dans une arène de test qui consistait en une boîte de Petri en plastique de 90 mm de diamètre, contenant une feuille de *V. faba* incorporée dans de la gélose à 1,5% sur laquelle 20 larves (âgés de 4 jours) pré-exposées (dix exposées à une solution de Surfactines à 1 g L⁻¹, dix exposées à la solution de contrôle) avaient été déposées 1 heure avant le début de l'expérience. Une gouttelette de peinture à base d'eau (bleue ou rouge, Posca PC-5M) avait été préalablement déposée sur l'abdomen de chaque puceron pour distinguer les larves exposées aux Surfactines et celles exposées à la solution contrôle. Les couleurs ont été permutées chaque jour pour éviter un effet de la couleur sur la sélection de l'hôte par les femelles parasitoïdes. Les observations ont commencé immédiatement après l'introduction de la femelle parasitoïde dans la boîte de Petri et ont duré 10 minutes. Le temps avant le premier élément comportemental enregistré (temps de latence)

et le premier choix (premier puceron avec lequel la femelle parasitoïde a débuté la séquence de comportement impliqué dans la sélection de l'hôte) ont été notés. La fréquence et la séquence des comportements suivants ont ensuite été enregistrées : examen antennaire (AE), flexion de l'abdomen (AB) et insertion de l'ovipositeur (OI). L'insertion de l'ovipositeur a été enregistrée chaque fois qu'une femelle parasitoïde entrait en contact physique avec un puceron à l'aide de son ovipositeur, tout en adoptant une position de ponte (flexion de l'abdomen). Pour l'analyse statistique du comportement de sélection de l'hôte, les comportements ont été considérés comme une série d'événements et seul l'événement final a été enregistré (par exemple, si une femelle parasitoïde a examiné à l'aide de ses antennes un puceron et a ensuite plié son abdomen, cela a été noté comme AB et non comme AE + AB). Pour évaluer la proportion d'OI résultant en une vraie ponte (OV), tous les pucerons piqués par une femelle ont été systématiquement disséqués dans une goutte de solution de NaCl (9‰) sous une loupe binoculaire pour calculer le taux de ponte réel ($\%_{OV} = \text{nombre d'OV} / \text{nombre d'OI}$).

II. 2. c. Analyses biochimiques

Dosage des lipides de pucerons

La quantification de la teneur en lipides a été réalisée sur des larves de 4 jours et des pucerons adultes de 10 jours. Les pucerons ont été lyophilisés à -20°C dans des flacons Eppendorf de 0,5 ml. Ils ont ensuite été pesés individuellement à 0,01 mg près pour obtenir leur masse fraîche à l'aide d'une microbalance de précision Mettler Toledo MT5 (Max : 3g, mini : mini = 1 µg, d = 1 µg). Ensuite, ils ont été séchés pendant 3 jours à 60°C pour obtenir leur masse sèche individuelle. Pour l'extraction des lipides, chaque puceron a été placé dans un tube Eppendorf contenant 1ml de solution de chloroforme/méthanol (1:2 v/v) et agité pendant 2 semaines. Après cela, les pucerons ont été mis à sécher à 60°C pendant 12h pour éliminer les restes de la solution précédente. Le contenu lipidique individuel (µg) a été calculé comme la différence de masse avant et après l'extraction des lipides. La teneur individuelle en lipides (%) a été calculée comme le contenu lipidique divisé par la masse sèche. Enfin, la teneur individuelle en eau (%) a été calculée comme la masse d'eau (masse fraîche - masse sèche) divisée par la masse fraîche. Cette méthodologie a été utilisée dans le chapitre 5, partie 1.

II. 2. d. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R, version 3.6.2 puis 4.2.1 (The R Foundation, <https://www.r-project.org/>). R studio a été utilisé comme environnement de développement (RStudio Inc, <https://www.rstudio.com/>).

La liste exhaustive des tests réalisés dans le cadre de cette thèse est détaillée dans le Tableau 3.

Des χ^2 d'homogénéité sont classiquement réalisés afin de vérifier que les répartitions de différents effectifs sont équivalentes. Cette méthode a été utilisée pour tester la significativité des différences de sex-ratio, de mortalité ou de choix.

Des test U de Mann-Whitney pour échantillons non-paramétriques indépendants ont été utilisés pour la masse des pucerons et parasitoïdes, chapitre 3, partie 2, et pour le premier choix par les femelles parasitoïdes chapitre 4, partie 2.

Des modèles linéaires généralisés (GLM) ont été utilisés pour l'étude de paramètres comportementaux et physiologique, en veillant à renseigner le modèle de distribution adapté au paramètre étudié (voir le Tableau 3 pour le détail).

Des régressions de Cox ont été utilisées pour analyser les données temporelles telles que la survie ou le temps d'accès à certains tissus de la plante en EPG.

Enfin, notamment dans des comparaisons deux à deux, des tests de permutations de Monte-Carlo ont été réalisés.

Tableau 3 : Détail des analyses statistiques utilisées dans la thèse, déclinées par chapitre

	Comportement du phytophage	Traits d'histoire de vie du phytophage	Parasitoïde
Chapitre 3. Les huiles essentielles : des perturbateurs du comportement des Hémiptères			
Partie 1 : Diffusion d'huile essentielle d'ail	<p><i>Comportement alimentaire (EPG)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Régression de Cox pour les données temporelles • Test de permutation pour les autres données <p><i>Choix</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • GLM (distribution : binomiale) 		
Partie 2 : Injection d'huile essentielle de cannelle dans le tronc	<p><i>Comportement alimentaire (EPG)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Régression de Cox pour les données temporelles • GLM pour les autres paramètres (pour les occurrences, distribution : Poisson ; pour les durées, distribution : gamma) 	<p><i>Masse</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Mann-Whitney <p><i>Survie</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • GLM (distribution : Poisson) 	
Chapitre 4. Perturbation par les biopesticides : exemple des lipopeptides			
Partie 1 : Effets des lipopeptides sur les pucerons	<p><i>Comportement alimentaire (EPG), Locomotion (vélocité, dispersion)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Test de permutation 	<p><i>Mortalité (à 1 et 24h)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Vraisemblance pénalisée de Firth 	
Partie 2 : Effets des Surfactines sur les pucerons et conséquence sur la sélection de l'hôte par les femelles parasitoïdes	<p><i>Comportement alimentaire (EPG), Locomotion (vélocité, dispersion)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Test de permutation 	<p><i>Mortalité (à 1 et 24h)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Khi² 	<p><i>Temps de latence</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Régression de Cox <p><i>Premier choix, Taux d'oviposition</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Khi² <p><i>Comportement du choix de l'hôte</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Mann-Whitney

Chapitre 5. Perturbations comportementales à travers la résistance des plantes et conséquences sur les interactions multitrophiques			
Partie 1 : Effet bottom-up de la résistance variétale du pommier domestique sur les pucerons et les parasitoïdes	<p>Comportement alimentaire (EPG)</p> <ul style="list-style-type: none"> Régression de Cox pour les données temporelles <p>GLMM pour les comparaisons entre les 3 cultivars de <i>M. domestica</i> (pour les occurrences, distribution : Poisson ; pour les durées, distribution : gamma)</p>	<p>Masse fraîche, contenu lipidique, teneur en lipides, teneur en eau</p> <ul style="list-style-type: none"> GLMM (distribution : gaussienne) <p>Période pré-reproductive</p> <ul style="list-style-type: none"> Régression de Cox 	<p>Durée de développement</p> <ul style="list-style-type: none"> Régression de Cox <p>Sex-ratio</p> <ul style="list-style-type: none"> GLMM (distribution : binomiale) <p>Taille des tibias</p> <ul style="list-style-type: none"> GLMM (distribution : gaussienne) <p>Charge en œufs</p> <ul style="list-style-type: none"> GLMM (distribution : Poisson)
Partie 2 : Lien entre structure génétique des populations de pommiers sauvages et comportement alimentaire des pucerons	<p>Comportement alimentaire (EPG)</p> <ul style="list-style-type: none"> Régression de Cox pour les données temporelles GLM pour les comparaisons entre les 3 populations de <i>M. sylvestris</i> et <i>M. domestica</i> (pour les occurrences, distribution : Poisson ; pour les durées, distribution : gamma) <p>Test de permutation pour les comparaisons entre les deux groupes de pommiers proches génétiquement</p>	<p>Masse</p> <ul style="list-style-type: none"> GLM (distribution : gamma) <p>Survie</p> <ul style="list-style-type: none"> Régression de Cox <p>Fécondité</p> <ul style="list-style-type: none"> GLM (distribution : Poisson) 	

Chapitre 3. Les huiles essentielles : des perturbateurs du comportement des Hémiptères

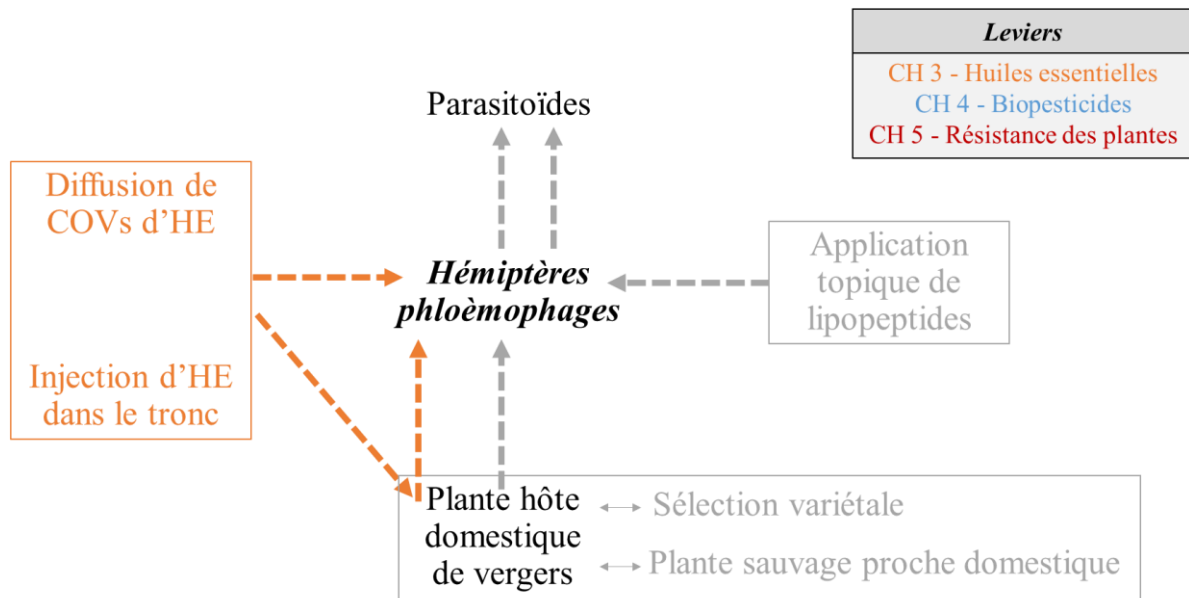


Figure 15 : Leviers basés sur l'utilisation d'huiles essentielles

Présentation de l'étude et principaux résultats :

Au cours de la colonisation de la plante hôte par les Hémiptères phloémophages, des médiateurs chimiques vont moduler le processus de sélection de la plante. Les médiateurs perçus vont varier en fonction de l'étape de la colonisation : avant le contact avec la plante les Hémiptères vont percevoir des COV émis par la plante, puis une fois en contact avec cette dernière des composés de surface, durant les phases de sondage des cellules du mésophylle, des métabolites secondaires, et enfin une fois le phloème atteint, les éléments nutritifs (métabolites primaires et sels minéraux) et les métabolites secondaires déterminant la qualité de la sève. Si des médiateurs chimiques n'appartenant pas à la plante hôte sont perçus, cette plante sera rejetée et la colonisation de la plante interrompue (Powell *et al.*, 2006). Dans une perspective agronomique de protection des cultures, ces médiateurs chimiques non-hôtes peuvent provenir de plantes compagnes ou d'huiles essentielles. Dans ce chapitre nous avons choisi d'explorer plus spécifiquement les méthodes basées sur le recours aux huiles essentielles.

Les huiles essentielles comprennent des métabolites secondaires synthétisés par certaines familles de plantes, comme les Myrtaceae, Lauraceae, Rutaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Cupressaceae, Poaceae, Zingiberaceae et Piperaceae (Baser & Buchbauer, 2009; Nerio *et al.*, 2010). Ces métabolites sont des composés volatils complexes qui peuvent être synthétisés par tous les organes végétaux et peuvent être stockés dans des cellules sécrétrices, des cellules épidermiques ou des trichomes glandulaires (Bakkali *et al.*, 2008). Beaucoup de ces composés ont des fonctions écologiques, que ce soit en tant que messagers internes, substances défensives, ou substances attractives pour les pollinisateurs et les ennemis naturels des ravageurs (Harrewijn *et al.*, 2002). Les huiles essentielles peuvent contenir une vingtaine à une soixantaine de composants, présents à des concentrations différentes. Pour une huile essentielle donnée, deux à trois composants majoritaires représentent 20 à 70% des composants de l'huile, et en déterminent généralement les propriétés biologiques (Bakkali *et al.*, 2008), bien que les composés minoritaires puissent participer à l'augmentation des effets de l'huile essentielle et qu'il existe des effets synergiques entre les différents composés.

Les effets de ces huiles sur les ravageurs dépendent notamment de leur mode d'exposition : inhalation, ingestion ou contact topique. Le travail de Mossa (2016) présente une revue bibliographique sur le sujet dont est faite une synthèse dans la suite de ce paragraphe. L'ensemble des effets des huiles essentielles sur les insectes ravageurs ont été observés principalement contre des insectes appartenant aux ordres des Lépidoptères, Diptères, Coléoptères et des Hémiptères. Les activités insecticides seraient liées aux forts taux de terpénoïdes, qui représentent la majeure partie des composants des huiles essentielles, notamment les monoterpénoïdes et les sesquiterpènes. Ces composés peuvent perturber le fonctionnement du système nerveux des insectes, en interagissant avec différents neurotransmetteurs telle que l'octopamine ou en perturbant l'activité de l'acétylcholinestérase. Au-delà de leurs effets neurotoxiques, les huiles essentielles et leurs composés ont des propriétés similaires à l'hormone juvénile et peuvent aussi agir comme des régulateurs de la

croissance des insectes. Les Lépidoptères sont les insectes les plus sensibles à cet effet des huiles essentielles, qui peut être obtenu lorsque l'insecte est exposé par ingestion ou inhalation. Les huiles essentielles peuvent aussi inhiber le potentiel de ponte des insectes, le taux d'éclosion des œufs et leur croissance (masse plus faible, allongement de la période larvaire). Au-delà d'un effet sur les traits d'histoire de vie, les huiles essentielles impactent grandement le comportement des insectes. Lorsqu'elles sont présentes dans l'air ou dans le substrat de ponte, les huiles essentielles peuvent perturber le comportement d'oviposition des insectes, ce qui peut à terme permettre de réduire la population d'un ravageur. Les effets répulsifs des huiles essentielles et ceux sur le comportement alimentaire sont bien décrits dans la littérature pour les Coléoptères et les Lépidoptères (Mossa, 2016). En ce qui concerne les Hémiptères, tandis que de nombreuses études ont mis en avant les effets des huiles essentielles sur leur comportement locomoteur (voir par exemple : Oulebsir-Mohandkaci & Kaki, 2015; Jiang *et al.*, 2016; Diaz-Montano *et al.*, 2007; Mann *et al.*, 2011), à notre connaissance très peu d'études existent quant aux effets des huiles essentielles sur le comportement alimentaire des pucerons et des psylles. Aboalfayah et Samara (2022) ont montré que suite à une vaporisation d'huile essentielle de lavande, d'eucalyptus *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae) Labill. et de moutarde, l'ingestion de sève phloémienne était retardée pour *M. persicae*. Cependant, Hori (1996) a lui montré que les huiles essentielles d'ail *Allium sativum* (Amaryllidaceae) L. et d'oignon *Allium cepa* (Amaryllidaceae) L., lorsqu'elles étaient incorporées dans une diète artificielle, n'avaient pas de pouvoir antiappétant envers *M. persicae*.

Du fait de leur répulsivité, les huiles essentielles peuvent perturber la phase de localisation de la plante, soit la première étape de la colonisation de la plante hôte par les Hémiptères. Du fait de leur antiappétance ou de leur toxicité, les huiles essentielles peuvent aussi empêcher l'acceptation finale de la plante lorsque les produits sont déposés sur la plante ou présents dans ses tissus. Selon le mode d'exposition, les perturbations potentielles de la localisation de la plante à distance se produisent si l'insecte inhale les COV, tandis que les effets sur l'acceptation de la plante hôte sont plutôt obtenus suite à l'ingestion de l'huile essentielle. Dans ce chapitre nous avons conduit deux études afin de caractériser les effets perturbateurs des huiles essentielles sur la capacité de colonisation des Hémiptères ravageurs de vergers selon deux modes d'exposition, par inhalation et par ingestion. Dans les deux études les effets des huiles essentielles ont été évalués sur le puceron cendré du pommier *D. plantaginea* et le psylle du poirier *C. pyri*.

Dans le premier article de ce chapitre, afin d'étudier la perturbation comportementale induite par l'inhalation des huiles essentielles, le comportement d'orientation et alimentaire des pucerons et des psylles a été étudié en présence de diffuseur contenant une huile essentielle, permettant un relargage des COV dans l'atmosphère. L'huile essentielle sélectionnée était une huile essentielle d'ail *A. sativum*, dont la répulsivité a été démontrée sur de nombreux ravageurs (Nerio *et al.*, 2010; Chaubey, 2014; Mobki *et al.*, 2014; Plata-Rueda *et al.*, 2017). Nos résultats montrent que l'huile essentielle utilisée dans notre étude était intrinsèquement répulsive et semblait masquer l'attractivité de la plante hôte. Cependant les COV de cette huile essentielle

ne semblent pas capables d'empêcher complètement la localisation des plantes dans la mesure où quand l'insecte était confronté à un choix entre une plante hôte associée à une huile essentielle d'ail versus une plante hôte seule, cette dernière n'était pas préférée. La présence des COV d'une huile essentielle d'ail a perturbé le comportement alimentaire des deux Hémiptères, principalement dans les tissus superficiels des plantes hôtes, laissant supposer un dépôt des COV à la surface des feuilles. Un retard d'accès au phloème a été observé pour les pucerons et les psylles ainsi qu'une durée d'ingestion de sève phloémienne réduite, dans ce cas seulement pour les psylles.

Dans le deuxième article de ce chapitre, afin d'étudier l'effet antiappétant des huiles essentielles, leur injection dans le système vasculaire de l'arbre nous a semblé pertinent afin que les pucerons et les psylles y soient exposés durant leur activité alimentaire. Le comportement alimentaire de *D. plantaginea* et *C. pyri* a été analysé sur deux pas de temps différents car les effets de l'injection de l'huile essentielle dans les pommiers semblent être dynamiques dans le temps (Werrie *et al.*, 2021). Une huile essentielle de cannelle de Chine *Cinnamomum cassia* (Lauracea) J. Presl a été sélectionnée pour ses effets notamment antiappétants (Huang & Ho, 1998; Kim *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2008) et sa faible phytotoxicité. La répercussion de la perturbation du comportement alimentaire sur la survie et la masse des pucerons et des psylles a aussi été explorée. L'injection de l'huile essentielle, du fait de son caractère antiappétant, a drastiquement réduit le nombre de pucerons ingérant de la sève phloémienne et entraîné leur mort par famine. Chez les psylles, l'activité dans le phloème n'était pas modifiée, mais autour du quatrième jour suivant l'injection de l'huile essentielle, le taux de survie des psylles s'est mis à diminuer sur les arbres injectés probablement à cause des propriétés toxiques de l'huile essentielle. Ces résultats sur pucerons et psylles suggèrent très fortement qu'une translocation de l'huile essentielle a eu lieu du xylème (dans lequel elles ont été injectées) au phloème. Suite à la période de dix jours durant laquelle la survie des pucerons et des psylles a été relevée, aucun impact n'a été observé sur la masse, et ce pour les deux espèces d'Hémiptères étudiées. Il est possible que les seuls survivants qui avaient été soumis aux plantes injectées soient plus résistants vis-à-vis de l'huile essentielle et seraient donc moins affectés par ses effets, ce qui pourrait expliquer l'absence de différence de masse entre les insectes élevés sur les plantes injectées et ceux élevés sur les plantes témoins.

Behavioral disruption of two orchard hemipteran pests by garlic essential oil

Thomas Denoirjean^{1,#} | Mélanie Rivière^{1,#} | Géraldine Doury¹ |
Guillaume Jean Le Goff² | Arnaud Ameline¹ 

¹ UMR CNRS 7058 EDYSAN, Université de Picardie Jules Verne, Amiens Cedex, France

² Earth and Life Institute, Biodiversity Research Centre, UC Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium

These authors contributed equally to this work.

Abstract

Essential oils (EOs) are promising sources of effective bioactive compounds for insect pest control, especially in heavily treated agrosystems like orchards. Plants belonging to the Amaryllidaceae family – onion, garlic (*Allium sativum* L.), and others – present an interesting potential in apple (*Malus domestica* Borkh.) and pear (*Pyrus communis* L., both Rosaceae) tree integrated pest management due to the repellent and deterrent properties of their chemical compounds. This study explores the potential disruption by garlic EOs of the behavior of two hemipteran pests towards their host trees: rosy apple aphid, *Dysaphis plantaginea* (Passerini) (Aphididae), on cultivated apple, and pear psyllid, *Cacopsylla pyri* (L.) (Psyllidae), on pear. Effects on orientation and feeding behavior were evaluated using choice tests and the electropenetrography (EPG) technique. The results revealed that garlic EOs delivered through rubber dispensers were intrinsically repellent, but when combined with the attractive host plant, the repellents and attractants canceled each other out for the two studied hemipterans. Garlic EOs caused disruptions in the feeding behavior of the two insects, particularly the psyllids, which showed a decrease in phloem sap intake. This study highlights the mechanisms disrupting the process of host-plant colonization, in particular the possible masking of host-locating cues or the involvement of confusing chemical stimuli due to EO volatiles.

Keywords

Allium sativum, Amaryllidaceae, Aphididae, *Cacopsylla pyri*, *Dysaphis plantaginea*, electrical penetration graph, EPG, Hemiptera, host-plant selection, integrated pest management, Psyllidae, volatile organic compound

1. Introduction

Manipulating the odorscape of insects is a key component of most pest control strategies. It can be achieved using natural chemical products such as those emitted by non-host plants (Conchou *et al.*, 2019). In particular, companion plants can disrupt the pest olfactory environment, owing to the chemical masking properties and/or repelling effects of non-host volatile organic compounds (VOCs) they naturally emit when associated with focal crops (Parker *et al.*, 2013). Exploiting other sources of non-host plant-derived odors can be attained with essential oils (EOs) that provide a wide range of bioactive compounds. Distilled from plants, EOs are highly volatile secondary metabolites that may play a key role in plant-insect interactions, such as alkaloids, amides, chalcones, flavones, kawapirones, lignans, neolignans, or phenols (Parmar *et al.*, 1997; Isman, 2000; Martínez *et al.*, 2015). Their lipophilic nature confers a broad range of action, enabling them to alter a variety of metabolic, biochemical, and physiological functions in insects (Tripathi *et al.*, 2009). The EOs can disrupt insect olfactory and/or gustatory systems and render their host plant unattractive, unpalatable, or unsuitable for reproduction (Gabryś *et al.*, 2006; Bedini *et al.*, 2020).

The effects of *Allium spp.* EOs, especially from garlic (*Allium sativum* L., Amaryllidaceae), on insect physiology and behavior have been studied extensively. Whether sprayed on the plants, fumigated, or topically applied to insects, garlic EOs display insecticidal properties against several orders including Blattodea, Isoptera, Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, and Hemiptera that can affect all developmental stages (Regnault-Roger & Hamraoui, 1995; Hori, 1996; Alghamdi, 2018; Bedini *et al.*, 2020; Sedthapong *et al.*, 2020). These lethal properties may be based on various mechanisms, impacting insect physiology and biochemistry, such as interruption of digestion via decreased activity of digestive enzymes (Shahriari & Sahebzadeh, 2017), inhibition of protein synthesis, and modification of energy metabolism as reported for *Myzus persicae* (Sulzer) or *Sitotroga cerealella* Olivier (Wu *et al.*, 2020). Diallyl trisulfide, the main component in garlic EO, has insecticidal properties against *S. cerealella* based on its effects on chitin, as it knocks down a chitin synthase gene, reducing its cuticular content as well as its thermal stability and crystallinity (Shah *et al.*, 2020, 2021). Similarly, the repellency of garlic EO volatiles has been demonstrated for various insect pests (Nerio *et al.*, 2010; Chaubey, 2014; Mobki *et al.*, 2014; Plata-Rueda *et al.*, 2017). However, to our knowledge, very few

studies have been dedicated to the underlying mechanisms responsible for pest behavior disruption by garlic EO.

Although it is generally assumed that EO volatiles may repel insect pests or interfere with their host plant colonization behavior, whether garlic EO VOCs could also affect their settling and feeding behavior remains unknown. For this reason, we investigated to what extent the potential disruption of insect behavior in the presence of garlic EO VOCs could explain its reported effectiveness as a biocontrol product, as shown for cereal aphids in the field by Zhou *et al.* (2016). This study tested the potential disruption by garlic EOs, delivered using rubber septum dispensers, of the colonization behavior of two orchard hemipteran pests, the rosy apple aphid, *Dysaphis plantaginea* (Passerini) (Aphididae), and the pear psyllid, *Cacopsylla pyri* (L.) (Psyllidae), toward their host trees, cultivated apple (*Malus domestica* Borkh.) and pear (*Pyrus communis* L., both Rosaceae), respectively.

Orchards represent a good case-study for investigating the use of natural products for disrupting insect behavior, as apples and pears, two of the most traded fruits in the world, receive numerous phytosanitary treatments (Drogué & DeMaria, 2012). The two hemipteran pests studied here are sap-sucking insects that cause direct damage to their host plants, weakening them and reducing their production by reducing nutrient intake. They also induce indirect damage by excreting honeydew, which enables the development of sooty molds on leaves and fruits. For psyllids, larvae are the life stage producing the largest amount of honeydew as they ingest phloem sap for a longer duration than adults do (Qubbaj *et al.*, 2005; Civolani *et al.*, 2011).

The colonization process of a host plant has been well documented for phloemophagous Hemiptera and especially for aphids. It has been divided into six distinct steps: (1) host plant location, (2) plant contact and evaluation of surface parameters, (3) stylet epidermal probing, (4) stylet activity in the plant, (5) phloem penetration by stylet and salivation, and (6) acceptance followed by phloem sap ingestion (Powell *et al.*, 2006). We hypothesized that garlic EO VOCs would negatively impact the host plant colonization behavior of the two hemipteran pests *D. plantaginea* and *C. pyri*. Host plant location (step 1) was assessed using a choice test and the subsequent host plant colonization processes (steps 2– 6) were evaluated through the electropenetrography (EPG) technique.

2. Material and methods

2.1. Insects and plants

A single colony of *D. plantaginea* provided by INRAE (Angers, France) was used. Sampled as a population in spring 2018 from an apple tree at the Agrocampus Ouest orchard (P. Robert, pers. comm.), this aphid population was mass reared without differentiating individual aphid

clones on *M. domestica* cv. 'Jonagold' plants obtained by in vitro multiplication (Druart, 1997). Mass rearing and experiments were performed in growth chambers under 20 ± 1 °C, $60 \pm 5\%$ r.h., and L16:D8 photoperiod. Synchronized first instars were obtained by placing parthenogenetic adult females on plantlets for 24 h before removing them. They were then reared for 10 days (corresponding to their pre-reproductive period) on apple plants inside Plexiglas aerated boxes ($36 \times 24 \times 14$ cm), then used as young apterous aphid adults for all experiments.

The psyllid population was initially collected in 2013 in the experimental pear orchard of 'Proefcentrum voor Fruitteelt' (Sint-Truiden, Belgium). They were reared at 24 ± 1 °C, $60 \pm 5\%$ r.h., and L16:D8 photoperiod on *P. communis* cv. 'Durondeau' plants obtained by in vitro multiplication. Second larval stages (L2) were then maintained under 20 ± 1 °C, $60 \pm 5\%$ r.h., and L16:D8 photoperiod until their use at L4-5 in all the experiments.

For all the bio-assays, the insects used had never been exposed to garlic EO prior to the experiments. During the experiments, they were never directly in contact with EO, they were only exposed to EO VOCs. The plants used for the experiments had a comparable phenological stage with 5–10 leaves per plant and 5–10 cm height (9 ± 2 weeks after potting).

2.2. Garlic essential oil

The garlic EO used in this study was a commercial preparation kindly provided by FERRANT PHE (Rodelinghem, France) and stored at 4 °C. The analysis of EO composition was verified independently by the laboratory Iteipmai (Chemillé-en-Anjou, France) and carried out using gas chromatography (GC). It was composed of diallyl trisulfide (29.7%), diallyl disulfide (25.7%), methyl allyl trisulfide (9.0%), diallyl sulfide (7.2%), methyl allyl disulfide (4.1%), and diallyl tetrasulfide (2.8%). A volume of 100 µl of garlic EO diluted in ethanol (vol/vol) was dispensed in a natural rubber septum (sleeve stopper septa white; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). To test the most effective garlic EO concentration, we performed preliminary tests on aphids based on Zhou *et al.* (2016) at concentrations 0.5, 1, 5, 25, and 50 mg of garlic EO per septum diluted in ethanol (5/95, 10/90, 25/75 and 50/50 respectively). When facing a choice between a septum filled with a garlic EO solution and a septum filled with ethanol, aphids made a choice only at the 5 mg dose, with a preference for ethanol vs. EO. At 0.5, 1, 25, and 50 mg, aphids made no choice, possibly because the dose of EO was too low (0.5 and 1 mg) to be repellent or too high (25 and 50 mg), therefore saturating the whole test set-up atmosphere with volatiles. Thus, the 5 mg dose was selected for all the experiments, for which the EO solution (or ethanol for controls) was deposited in the septa and allowed to impregnate the rubber for 15 h before use in the experiments.

2.3. Choice tests

Choice bio-assays were performed to first verify the putative repellent properties of garlic EO volatiles on one hand, and the putative attractiveness of the host plant of each hemipteran pest on the other hand. Then, the balance between putative repellency and attractiveness was assessed by combining garlic EO and the host plant. Aphid/psyllid choice was tested in a set-up allowing contact-based, odor-based, and visual cues, adapted from Baudry *et al.* (2021) (Figure S1). This set-up consisted of a black plastic bridge (12 × 2 cm) allowing the insect to move between two sources involving either an upper leaf alone, a rubber septum alone, or a combination of both. Each septum was hung using an iron wire inserted into the pot substrate, at a height corresponding to that of upper leaves (i.e., 5–10 cm) and located 2 cm away from the leaf. Each individual hemipteran was given a choice between two sources: (A) a rubber septum filled with either ethanol (ETH) or garlic essential oil (EO); (B) a host plant (HP) and a blank (BLK) consisting of a pot that only contained potting soil; (C) a host plant associated with a rubber septum containing garlic EO (HP + EO) and a blank (BLK); or (D) a host plant associated with a rubber septum containing garlic EO (HP + EO) and a host plant associated with a rubber septum filled with ethanol (HP + ETH). A single hemipteran (young aphid adult or L4-5 psyllid) was placed in the middle of the bridge linking the two sources for each test (A-D). Each individual was observed for 5 min or until it had made a choice (i.e., contact with the host plant or reaching one extremity of the plastic bridge if the tested source did not involve a host plant). The latency time from the deposition of each insect on the bridge to the choice made was also recorded. The non-responding insects were counted (i.e., those that had made no choice within 5 min). To minimize external stimuli, the set-up was covered with white paper and a white fluorescent tube was positioned above. The test sources were randomly placed in order to avoid any bias due to position effect. Each test was conducted with at least 28 individuals per species.

2.4. Aphid and psyllid feeding behavior

Feeding behavior was studied using the EPG method (Tjallingii, 1985). An electrode consisting of a 2-cm-long copper wire soldered to the head of a 2.2-mm-diameter brass nail was used to wire the insects. The other end of the electrode consisted of a thin 20- μ m-diameter and 2-cm-long gold wire glued to the copper wire portion of the electrode. A droplet of conductive water-based silver glue was used to attach the gold wire to the copper wire of the electrode, and another was deposited on the abdomen of aphids/psyllids to attach them to the extremity of the gold wire. Gold wire and silver glue were provided by EPG Systems (Wageningen, The Netherlands). Eight individual insects were connected to the Giga-8 DC-EPG amplifier (EPG Systems), each being placed on the abaxial side of a new growing leaf of an individual plant as described in Denoirjean *et al.* (2021) for aphids and Civolani *et al.* (2011) for psyllids. The distance between the rubber septum and the insect on its leaf was approximately 3–4 cm. The

recordings were performed continuously for 8 h during the photophase inside a Faraday cage. The EPG data were digitized using a DI-710-UH analog-to-digital board (Dataq Instruments, Akron, OH, USA) and recorded using STYLET+ software (EPG Systems), at a sample rate of 100 Hz, input impedances (R_i) of $10^9 \Omega$, and DC substrate voltage. Analysis of the EPG waveforms was carried out using the STYLET+ software (EPG Systems). Parameters from the recorded waveforms were calculated with EPG-CALC v.6.1.7 software (Giordanengo, 2014). They were based on different EPG waveforms, described by Tjallingii & Esch (1993) for aphids and Civolani *et al.* (2011) for psyllids, and corresponded to: Pr = stylet activity within plant tissues, C = stylet pathways in plant tissues except phloem and xylem, E1 = salivation in phloem elements, E2 = passive phloem sap ingestion, G = active xylem sap ingestion, and F = derailed stylet mechanics (only described in aphids). In total 24 plants per treatment were used for the EPG measurements. EPG recordings were obtained from 37 aphids and 29 psyllids on their respective host plant in the presence of a rubber septum filled with garlic EO, and from 55 aphids and 31 psyllids for the controls. Controls consisted of aphids or psyllids feeding on their respective host plant in presence of a rubber septum filled with ethanol.

2.5. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R v.3.6.2 (R Core Team, 2019) with $\alpha = 0.05$. The effects of garlic EO on the choices of aphids and psyllids were analyzed using generalized linear models (GLM) with a binomial distribution, with test and insect species as explanatory variables. Latency times in the choice tests were compared using the Cox proportional hazards (CPH) regression model, which is adapted to treat time-dependent parameters. The assumption of validity of proportional hazards was validated using the function ‘coxph’ in the R package ‘survival’ v.3.1.8 (Therneau & Grambsch, 2000; Therneau, 2019). The impact of garlic EO on aphid and psyllid feeding behavior (i.e., measured EPG parameters) was tested with a Monte-Carlo permutation test (5000 replicates). Medians were compared for the following parameters: total duration of probing (s_{Pr}), number of probes (n_{Pr}), median duration of probing events (m_{Pr}), time to first probe ($t.1Pr$), total duration of ‘pathway phase’ (s_C), total duration of phloem sap ingestion (s_{E2}), median duration of phloem sap ingestion events (m_{E2}), time to first phloem sap ingestion ($t.1E2$), total duration of stylet derailment (s_F), median duration of stylet derailment events (m_F), and total duration of xylem sap ingestion (G). The mean time to first probe and the time to the first phloem sap ingestion were tested using a CPH regression model.

3. Results

3.1. Choice tests

Hemipteran preference differed between tests, but not between species (GLM, test: $\chi^2 = 11.69$, d.f. = 3, $P = 0.009$; Hemiptera species: $\chi^2 = 0.88$, d.f. = 1, $P = 0.35$; test*species: $\chi^2 = 2.28$, d.f. = 3, $P = 0.52$). Aphids and psyllids significantly preferred ethanol vs. garlic EO (test A), and insects migrated significantly more towards a host plant than towards the blank (test B). Aphid or psyllid preference did not differ significantly when offered the combination of host plant + EO vs. blank or host plant + ethanol (tests C and D; Figure 1). The proportion of non-responding insects did not differ between the tests.

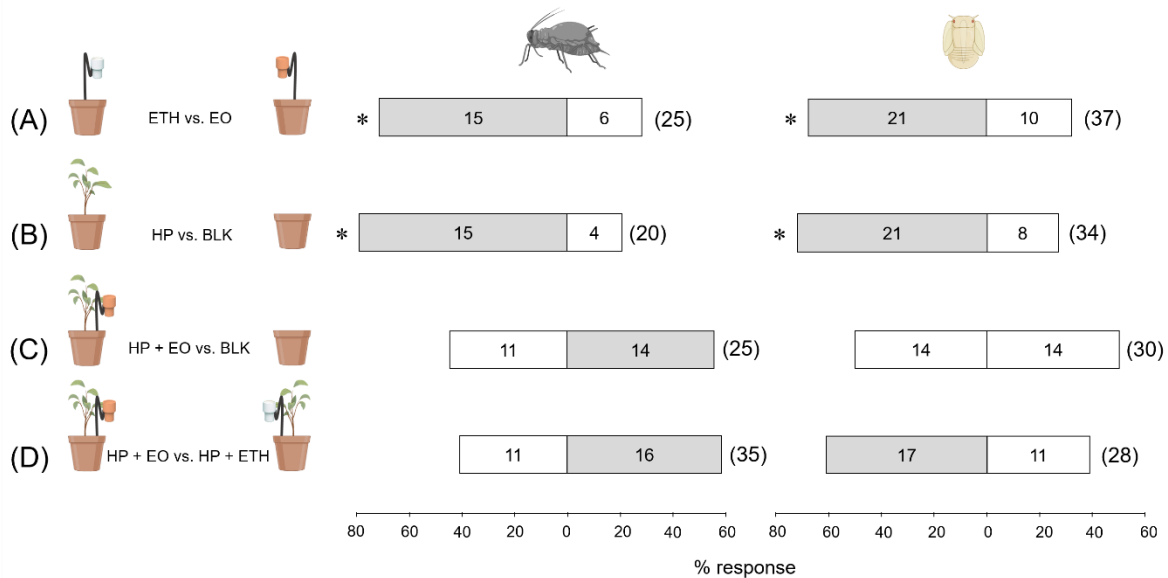


FIGURE 1 Responses of rosy apple aphid (left) and pear psyllid (right) when given a choice between (A) a rubber septum filled with ethanol (ETH) vs. a rubber septum containing garlic essential oil (EO), (B) a host plant (HP) (apple or pear) vs. a blank (BLK; a pot with potting soil), (C) HP + EO vs. BLK, and (D) HP + EO vs. HP + ETH. An asterisk indicates a preference (i.e., a significant deviation from 50:50 distribution; GLM: $P < 0.05$). Numbers in parentheses indicate the total numbers of insects tested. Grey bars indicate the greatest numbers of insects recorded

Latency times of both aphids and psyllids did not differ in the first three tests (CPH model; aphids, test A: $\chi^2 = 0.48$, $P = 0.49$; test B: $\chi^2 = 1.89$, $P = 0.17$; test C: $\chi^2 = 0.001$, $P = 0.97$; psyllids, test A: $\chi^2 = 0.07$, $P = 0.78$; test B: $\chi^2 = 2.35$, $P = 0.12$; test C: $\chi^2 = 0.10$, $P = 0.76$; all d.f. = 1). Aphids responded faster when they were offered the choice between host plant + ethanol vs. host plant + EO (test D: $\chi^2 = 4.10$, d.f. = 1, $P = 0.043$), whereas no difference was observed for psyllids ($\chi^2 = 1.59$, d.f. = 1, $P = 0.21$) (Table 1).

TABLE 1 Mean (\pm SEM; sample sizes in parentheses) latency time (s) before choices were made by rosy apple aphid and pear psyllid when given a choice between (A) a rubber septum filled with ethanol (ETH) vs. a rubber septum containing garlic essential oil (EO), (B) a host plant (HP) (apple or pear) vs. a blank (BLK; a pot with potting soil), (C) HP + EO vs. BLK, and (D) HP + EO vs. HP + ETH

Test		Aphids	Psyllids
A	ETH vs. EO	55.67 \pm 15.61 (15) vs. 62.00 \pm 13.45 (6)	55.52 \pm 11.93 (21) vs. 70.90 \pm 20.81 (10)
B	HP vs. BLK	72.07 \pm 18.09 (15) vs. 26.25 \pm 4.15 (4)	71.70 \pm 12.99 (21) vs. 125.50 \pm 37.42 (8)
C	HP + EO vs. BLK	80.21 \pm 18.74 (14) vs. 83.18 \pm 15.93 (11)	56.50 \pm 18.53 (14) vs. 62.29 \pm 14.23 (14)
D	HP + EO vs. HP + ETH	92.82 \pm 21.21a (11) vs. 60.69 \pm 8.19b (16)	59.54 \pm 22.10 (11) vs. 35.00 \pm 8.48 (17)

Means followed by different letters are significantly different (CPH model: $P < 0.05$).

3.2. Feeding behavior

Aphids

The total duration of stylet probing did not differ for aphids exposed to garlic EO volatiles compared to the control and lasted *ca.* 6 h. The median duration of probing events and the time to first probe did not differ, but the number of probes was 1.5× greater in the presence of garlic EO. The duration of the pathway phase, which represented *ca.* 60% of the total activity, was not impacted by the presence of garlic EO. No difference was observed in the phloem phase, although the total duration of phloem sap ingestion for aphids exposed to garlic EO was 1.3× shorter (*ca.* 0.5 h) compared to controls. The median duration of phloem sap ingestion events did not differ, and lasted *ca.* 20 min. However, the time before the first phloem sap ingestion was 1.7× longer in the presence of garlic EO, as the aphids on average needed an additional hour to start ingesting phloem sap. Although the total duration of stylet derailment was not impacted, the median duration of stylet derailment events was 1.7× longer (*ca.* 22 min) when exposed to garlic EO volatiles compared to controls. Total duration of xylem sap ingestion did not differ significantly, even though aphids in the presence of garlic EO ingested xylem sap for almost 2 h, whereas control aphids did so for *ca.* 1 h (Table 2).

Psyllids

Psyllids exposed to garlic EO volatiles had a 1.1× shorter (*ca.* 30 min) total duration of stylet probing compared to controls. The number of probes, the median duration of probing events, and the time before the first probe did not differ. No impact was found on the duration of the pathway phase, which represented *ca.* 55 and 70% of the total activity for control psyllids and psyllids exposed to garlic EO, respectively. In the phloem phase, the total duration of sap ingestion was 2× shorter in the presence of garlic EO: psyllids exposed to EO volatiles ingested phloem sap for *ca.* 1 h whereas control psyllids ingested sap for *ca.* 2 h. However, the median duration of phloem sap ingestion events was not affected. The time before the first phloem sap ingestion was 1.5× greater in the presence of garlic EO, on average they needed 100 min more to start ingesting phloem sap compared to controls. Xylem sap ingestion was not affected by garlic EO volatiles (Table 3).

TABLE 2 Mean (\pm SEM; n indicates sample sizes) feeding behavior parameters of rosy apple aphid on apple depending on the rubber septum associated with the plant, either filled with ethanol (control) or with garlic essential oil (EO)

Aphid electrical penetration graph (EPG) classes	Control	Garlic EO	χ^2	d.f.	P
General probing behavior phase	n = 37	n = 55			
s_Pr: total duration of probing (min)	384.09 \pm 9.44	361.10 \pm 7.47		1	0.07
n_Pr: no. probes	13.03 \pm 1.67	18.97 \pm 1.54		1	0.008
m_Pr: median duration of probing events (min)	16.66 \pm 4.36	18.10 \pm 6.50		1	0.14
t.1Pr: time to first probe (min)	19.36 \pm 6.28	16.12 \pm 3.02	0.090	1	0.77
Pathway phase	n = 37	n = 55			
s_C: total duration of pathway phase (min)	212.25 \pm 11.47	224.84 \pm 11.36		1	0.62
Phloem phase	n = 32	n = 42			
s_E2: total duration of phloem sap ingestion (min)	122.41 \pm 18.49	92.72 \pm 17.17		1	0.13
m_E2: median duration of phloem sap ingestion events (min)	23.56 \pm 7.82	21.81 \pm 7.18		1	0.23
t.1E2: time to first phloem sap ingestion (min)	126.11 \pm 17.43	211.12 \pm 19.30	6.17	1	0.013
Other phases	n = 15	n = 21			
s_F: total duration of stylet derailment (min)	57.01 \pm 14.25	71.22 \pm 6.16		1	0.11
m_F: median duration of stylet derailment events (min)	29.97 \pm 8.19	51.60 \pm 7.29		1	0.026
G: total duration of xylem sap ingestion (min)	n = 24 59.60 \pm 12.00	n = 10 113.24 \pm 35.81		1	0.12

Statistical comparison based on CPH model (for ‘time to first probe’ and ‘time to first phloem sap ingestion’) or permutation test (all other parameters; both $P < 0.05$).

TABLE 3 Mean (\pm SEM; n indicates sample sizes) feeding behavior parameters of pear psyllid on pear depending on the rubber septum associated with the plant, either filled with ethanol (control) or containing garlic essential oil (EO)

Psyllid electrical penetration graph (EPG) classes	Control	Garlic EO	χ^2	d.f.	P
General probing behavior phase	n = 29	n = 31			
s_Pr: total duration of probing (min)	447.58 \pm 6.23	416.48 \pm 9.64		1	0.005
n_Pr: no. probes	6.17 \pm 0.76	9.32 \pm 1.16		1	0.13
m_Pr: median duration of probing events (min)	98.83 \pm 27.23	62.91 \pm 22.82		1	0.14
t.1Pr: time to first probe (min)	11.36 \pm 3.59	6.94 \pm 1.28	0.41	1	0.52
Pathway phase	n = 29	n = 31			
s_C: total duration of pathway phase (min)	244.46 \pm 18.15	283.55 \pm 16.02		1	0.62
Phloem phase	n = 26	n = 20			
s_E2: total duration of phloem sap ingestion (min)	111.24 \pm 18.59	54.27 \pm 13.87		1	0.017
m_E2: median duration of phloem sap ingestion events (min)	65.57 \pm 11.03	47.66 \pm 14.34		1	0.16
t.1E2: time to first phloem sap ingestion (min)	224.21 \pm 22.42	325.20 \pm 20.50	11.42	1	<0.001
Other phases	n = 16	n = 20			
G: total duration of xylem sap ingestion (min)	45.67 \pm 7.84	63.99 \pm 12.50		1	0.86

Statistical comparison based on CPH model (for ‘time to first probe’ and ‘time to first phloem sap ingestion’) or permutation test (all other parameters; both P<0.05).

4. Discussion

This study revealed a disturbance induced by VOCs from garlic EO on *M. domestica* and *P. communis* host plant colonization behavior of the two orchard hemipteran pests, *D. plantaginea* and *C. pyri*. Garlic EO was observed to be intrinsically repellent, but when combined with the attractive host plant, the repellents and attractants canceled each other out. Moreover, garlic EO caused disruptions in feeding behavior of both pests, especially of psyllids, as a decrease in phloem sap intake indicated reduced plant acceptance. The disturbance may be explained by masking of host-locating cues or reduced feeding by confusing olfactory stimuli (Perrin & Phillips, 1978).

The two main compounds of garlic EO used here, diallyl disulfide and diallyl trisulfide, represent up to 60% of the odor bouquet, which is similar to the chemical composition of garlic EO in numerous other studies (e.g., Edris & Fadel, 2002; Satyal *et al.*, 2017). These two compounds are responsible for the repellent properties of garlic EO to Diptera and Coleoptera (Campbell *et al.*, 2011; Plata-Rueda *et al.*, 2017). Our study showed that garlic EO was repellent for two hemipteran orchard pests, which matches the effect already observed on other aphid species such as the highly polyphagous *M. persicae* and the cereal aphid *Sitobion avenae* (Fabricius) (Dancewicz & Gabryś, 2008; Zhou *et al.*, 2016). Moreover, dimethyl trisulfide is the most repellent compound of garlic chive (*Allium tuberosum* Rottler ex Spreng.) volatiles to the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama; disulfides (dimethyl disulfide, allyl methyl disulfide, and allyl disulfide) are less repellent, whereas monosulfides do not affect the orientation behavior of *D. citri* (Mann *et al.*, 2011). The repellency of the EO used in our study can be explained by its composition, as trisulfides corresponded to ca. 39% (diallyl trisulfide 29.7%, methyl allyl trisulfide 9.0%) and disulfides represented ca. 30% (diallyl disulfide 25.7%, methyl allyl disulfide 4.1%) of the oil.

Our study also showed that the repellency of the rubber septum filled with garlic EO was counterbalanced by the attractiveness of the host plant (HP + EO vs. blank), as no preference between the two sources and no difference in latency time was observed. This is consistent with the study of Baudry *et al.* (2021), who showed that although *M. persicae* was attracted by VOCs of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) and repelled by leek (*Allium porrum* L.), the combination of those odors was neither repellent nor attractive to *M. persicae*. Similarly, garlic chive (*A. tuberosum*) and wild onion (*Allium canadense* L.) volatiles affect the attractiveness of *D. citri* towards volatiles of its host plant *Citrus spp.* (Mann *et al.*, 2011). This could be due to masking or disruption by the garlic EO of the host plant attractiveness (Nottingham *et al.*, 1991; Schröder & Hilker, 2008). In our study, we expected the insects to prefer the attractive host plant (HP + ETH) rather than the neutral complex (HP + EO). Although this was not significant, when aphids were given a choice between these two sources, 60% of the individuals preferred HP + ETH. This tendency was confirmed by their significantly shorter latency time to reach the HP + ETH source, indicating a greater motivation to move towards an attractive odor source.

Overall, the garlic EO volatiles induced a disruption of the feeding behavior of both hemipteran species on their respective host plants. However, their probing behavior was not drastically modified by these non-host volatiles: among the feeding parameters selected, only three out of 11 were altered for aphids, and three out of nine for psyllids (including duration of phloem sap ingestion, the acceptance parameter). Although for *D. plantaginea* aphids the total time allocated to stylet penetration (i.e., general probing phase) was unchanged, garlic EO volatiles disrupted the feeding activity through a greater number of probes performed (n_Pr). Dardouri *et al.* (2021) showed that the repellent effect of the two companion plants *Tagetes patula* L. (marigold) and *Ocimum basilicum* L. (basil) translated into greater numbers of probes (n_Pr) and a shorter total duration of probing (s_Pr) for *M. persicae* on sweet pepper. Although the pathway phase was not altered in our experiment, garlic EO seemed to have impacted behavioral phases within mesophyll occurring before the initiation of sap ingestion, which was shown by an increase in the median duration of stylet derailment events. Stylet derailment is usually attributed to mechanical stylet difficulties, although it remains difficult to interpret. The stylets of aphids may struggle to penetrate the mesophyll tissues if they lose their proper position in the stylet sheath (Tjallingii, 1988). Aphids on resistant or insecticide-treated plants have a greater frequency and duration of stylet derailment mechanics compared to aphids on more suitable plants (Marchetti, 2009; Garzo *et al.*, 2020). This alteration was probably due to physical or chemical changes in peripheral plant tissues and could partially explain the delayed access to phloem tissues recorded. Indeed, Dancewicz *et al.* (2016), using aphids as sensors, indirectly demonstrated that exogenous volatiles may penetrate the plant cuticle and epidermis, and pass into deeper tissue layers. However, the apple tree acceptance (e.g., the time to first phloem sap ingestion) was not impacted, even if the total duration of phloem sap ingestion was reduced by 25% for aphids exposed to garlic EO volatiles.

Garlic EO volatiles did not seem to impact any of the behavioral phases within peripheral tissues, occurring before the initiation of sap ingestion by *C. pyri* psyllids. Neither the time to first probe (t.1Pr) nor the parameters of the pathway phase were changed, suggesting that the hypothesis that EO VOCs could be absorbed into the pear leaf cuticle was not supported, although such phenomena have already been shown in other studies of non-host plant volatiles (Himanen *et al.*, 2010; Camacho- Coronel *et al.*, 2020), particularly in a study also involving VOCs from *Allium spp.* (Dahlin *et al.*, 2015). The modifications of *C. pyri* feeding behavior in the presence of garlic EO are more likely to be attributed to changes occurring in non-superficial tissues of the host plant, such as those affecting vascular tissues. The duration of phloem sap ingestion was almost 50% shorter whereas the time to first phloem sap ingestion was 45% longer. Similar alterations were observed for *C. pyri* nymphs on a resistant *P. communis* cultivar compared to a sensitive one (Civolani *et al.*, 2013). The disruption to *C. pyri* phloem sap ingestion when garlic EO was present could globally reflect their host plant acceptance disturbance (Powell *et al.*, 2006). This is in accordance with a study of *M. persicae* feeding behavior on *Tanacetum vulgare* L. sprayed with *Allium cepa* L. (onion) extracts (Dancewicz *et al.*, 2011), showing post-ingestion deterrent activity previously defined by Chyb *et al.* (1995).

Similar disruption (decreased phloem sap ingestion) was shown in aphid host plant acceptance caused by leek as a companion plant (Baudry *et al.*, 2021).

Finally, the behavioral disruptions in both aphids and psyllids in the presence of garlic EO could also be partially explained by the deterrent properties of two of its main compounds, diallyl trisulfides and methyl diallyl disulfides. Methyl allyl disulfide, and to a greater extent diallyl trisulfide, not only present toxicant and fumigant properties, but also antifeedant activities on the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Motschulsky), and the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Huang *et al.*, 2000). The neurotoxic action of non-host plant and EO volatiles on insects via inhalation (e.g., Regnault-Roger *et al.*, 2012; Petrakis *et al.*, 2014) could partially explain the negative alterations of feeding behaviors found in our study. Moreover, despite the direct effects of garlic EO on aphid and psyllid behavior, it cannot be completely ruled out that volatiles released by rubber septa could also have indirectly modified the insect feeding behavior by modifying the host-plant chemistry, and in particular by enhancing host-plant defense mechanisms. Certain VOCs stimulate neighboring plants to adjust their defenses at the right time and subsequently reduce feeding by phytophagous insects (Karban *et al.*, 2014; Ninkovic *et al.*, 2019; Tolosa *et al.*, 2019). A longer duration of xylem sap ingestion could be considered as an aphid stress indicator associated with induced plant defenses (Prado & Tjallingii, 1997; Sauge *et al.*, 2002). Such putative stress induced by garlic EO volatiles was partially observed here, although these differences were not significant: the duration of xylem sap ingestion increased by 90% for aphids and by 40% for psyllids in the presence of garlic EO volatiles.

5. Conclusion

Few studies have investigated a common method that would enable regulation of pest pressure on both apple and pear trees. Our work revealed that the use of garlic EOs as a source of non-host volatiles may not be suitable in a context of integrated pest management in orchards, as the repellent properties of EOs were not powerful enough to overcome the attractiveness of the host plant. *Dysaphis plantaginea* is not known as a vector of plant viruses, contrary to *C. pyri*, which transmits phytoplasma. The use of garlic EOs could limit pathogen transmission by *C. pyri* as it is linked to phloem activity (Mustafa *et al.*, 2015; Kaya *et al.*, 2016), which was negatively impacted in this study. Furthermore, notably in aphids, a decrease in phloem sap ingestion is often linked to a decrease in survival and/or fecundity and, consequently, a decrease in vector population (Chesnais *et al.*, 2019). Finally, although we highlighted a disruption of host plant colonization, further studies on Hemiptera life-history traits are needed as garlic EO volatiles can exhibit toxicological effects on insects (Park *et al.*, 2006; Plata-Rueda *et al.*, 2017). As winged hemipteran insects are adapted to disperse and locate new hosts, additional

experimental studies on apple and pear plant selection disturbance by EOs or companion plants should also focus on alate aphid and psyllid colonizers.

Author contributions

Thomas Denoirjean: Data curation (equal); formal analysis (equal); investigation (equal); methodology (equal); writing – original draft (equal). Mélanie Rivière: Data curation (equal); formal analysis (equal); investigation (equal); methodology (equal). Géraldine Doury: Conceptualization (equal); data curation (equal); funding acquisition (equal); methodology (equal); supervision (equal); validation (equal); writing – original draft (equal). Guillaume Jean Le Goff: Methodology (equal); supervision (equal); validation (equal); writing – original draft (equal). Arnaud Ameline: Conceptualization (equal); funding acquisition (equal); methodology (equal); supervision (equal); validation (equal); writing – original draft (equal).

Acknowledgments

This work was supported by the projects PROVERBIO (Protection of orchards by biological control: an adapted selection of auxiliaries) and ZERO-PH(F)YTO F&L(G) financed by the European Union, under the scope of the FEDER program and INTERREG initiative: Programme 2014 - 2020 INTERREG V-A Belgium - France (France – Wallonie - Vlaanderen). GJLG was supported by grant D31-1394 of the Walloon Region. We thank Philippe Robert (INRAE Agrocampus Ouest, Angers, France) for providing the population of *Dysaphis plantaginea* and FERRANT PHE (Rodelinghem, France) for kindly providing the garlic essential oil. Françoise Dubois is thanked for her technical assistance. We thank Marie-Pierre Boley for her help with the administrative tasks, and Andrew Roots for the critical reading of the English. This publication is number BRC 387 of the Biodiversity Research Centre.

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

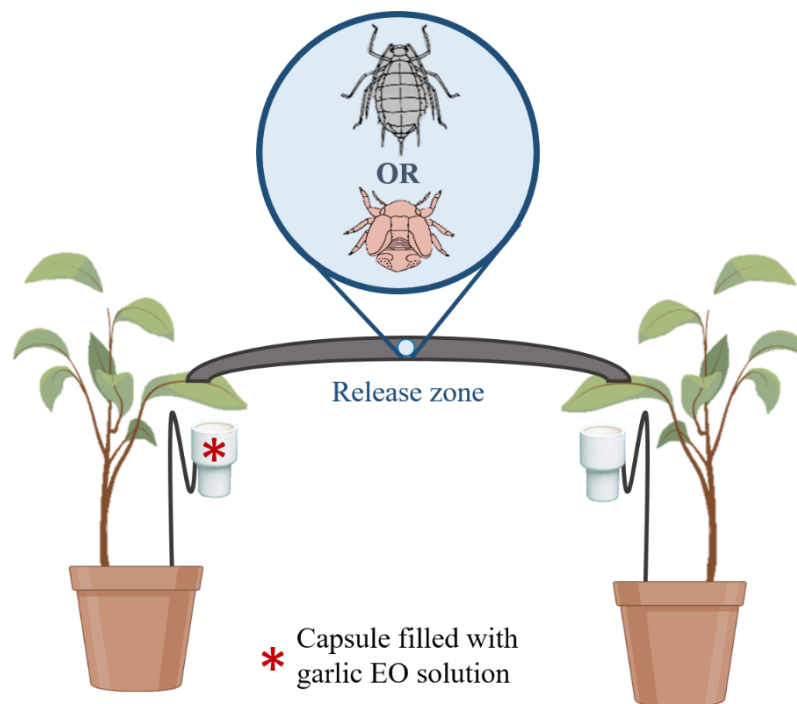
Conflict of interest declaration

The authors declare no conflict of interest.

ORCID

Arnaud Ameline <https://orcid.org/0000-0002-1926-8854>

Supplementary material



SUPPLEMENTARY FIGURE 1 Schematic representation of the arena for choice bio-assays. The example shown here is the (D) modality.

References

- Alghamdi AS (2018) Insecticidal effect of four plant essential oils against two aphid species under laboratory conditions. *Journal of Applied Biology & Biotechnology* 6: 27–30.
- Baudry X, Doury G & Couty A (2021) Antagonist effects of the leek *Allium porrum* as a companion plant on aphid host plant colonization. *Scientific Reports* 11: 4032.
- Bedini S, Guarino S, Echeverria MC, Flamini G, Ascriczzi R *et al.* (2020) *Allium sativum*, *Rosmarinus officinalis*, and *Salvia officinalis* essential oils: a spiced shield against blowflies. *Insects* 11: 143.
- Camacho- Coronel X, Molina-Torres J & Heil M (2020) Sequestration of exogenous volatiles by plant cuticular waxes as a mechanism of passive associational resistance: a proof of concept. *Frontiers in Plant Science* 11: 121.
- Campbell C, Gries R, Khaskin G & Gries G (2011) Organosulphur constituents in garlic oil elicit antennal and behavioural responses from the yellow fever mosquito. *Journal of Applied Entomology* 135: 374–381.

- Chaubey MK (2014) Biological activities of *Allium sativum* essential oil against pulse beetle, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). *Herba Polonica* 60: 41–55.
- Chesnais Q, Couty A, Uzest M, Brault V & Ameline A (2019) Plant infection by two different viruses induce contrasting changes of vectors fitness and behavior. *Insect Science* 26: 86–96.
- Chyb S, Eichenseer H & Hollister B (1995) Identification of sensilla involved in taste mediation in adult western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *Journal of Chemical Ecology* 21: 313–329.
- Civolani S, Grandi G, Chicca M, Pasqualini E, Fano EA & Musacchi S (2013) Probing behaviour of *Cacopsylla pyri* on a resistant pear selection. *Journal of Applied Entomology* 137: 365–375.
- Civolani S, Leis M, Grandi G, Garzo E, Pasqualini E *et al.* (2011) Stylet penetration of *Cacopsylla pyri*; an electrical penetration graph (EPG) study. *Journal of Insect Physiology* 57: 1407–1419.
- Conchou L, Lucas P, Meslin C, Proffit M, Staudt M & Renou M (2019) Insect odorscapes: from plant volatiles to natural olfactory scenes. *Frontiers in Physiology* 10: 972.
- Dahlin I, Vucetic A & Ninkovic V (2015) Changed host plant volatile emissions induced by chemical interaction between unattacked plants reduce aphid plant acceptance with intermorph variation. *Journal of Pest Science* 88: 249–257.
- Dancewicz K & Gabryś B (2008) Effect of extracts of garlic (*Allium sativum* L.), wormwood (*Artemisia absinthium* L.) and tansy (*Tanaceum vulgare* L.) on the behaviour of the peach potato aphid *Myzus persicae* (Sulz.) during the settling on plants. *Pestycydy/Pesticides* 2008: 93–99.
- Dancewicz K, Gabryś B & Przybylska M (2011) Effect of garlic (*Allium sativum* L.) and tansy (*Tanaceum vulgare* L.) extracts and potassic horticultural soap on the probing and feeding behaviour of *Myzus persicae* (Sulzer, 1776). *Aphids and Other Hemipterous Insects* 17: 129–136.
- Dancewicz K, Sznajder K, Załuski D, Kordan B & Gabryś B (2016) Behavioral sensitivity of *Myzus persicae* to volatile isoprenoids in plant tissues. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 160: 229–240.
- Dardouri T, Gomez L & Ameline A (2021) Non-host volatiles disturb the feeding behavior and reduce the fecundity of the green peach aphid, *Myzus persicae*. *Pest Management Science* 77: 1705–1713.
- Denoirjean T, Doury G, Cornille A, Chen X, Hance T & Ameline A (2021) Genetic structure of *Malus sylvestris* and potential link with preference/performance by the rosy apple aphid pest *Dysaphis plantaginea*. *Scientific Reports* 11: 5732.
- Drogué S & DeMaria F (2012) Pesticide residues and trade, the apple of discord? *Food Policy* 37: 641–649.
- Druart P (1997) Optimization of culture media for in vitro rooting of *Malus domestica* Borkh. cv. Compact Spartan. *Biologia Plantarum* 39: 67–77.
- Edris AE & Fadel HM (2002) Investigation of the volatile aroma components of garlic leaves essential oil. Possibility of utilization to enrich garlic bulb oil. *European Food Research and Technology* 214: 105–107.

- Gabryś B, Szczepanik M, Dancewicz K, Szumny A & Wawrzeńczyk C (2006) Environmentally safe insect control: feeding deterrent activity of alkyl-substituted γ - and δ -lactones to peach potato aphid (*Myzus persicae* [Sulz.]) and Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say). Polish Journal of Environmental Studies 15: 549–556.
- Garzo E, Moreno A, Plaza M & Fereres A (2020) Feeding behavior and virus-transmission ability of insect vectors exposed to systemic insecticides. Plants 9: 895.
- Giordanengo P (2014) EPG-Calc: a PHP-based script to calculate electrical penetration graph (EPG) parameters. Arthropod-Plant Interactions 8: 163–169.
- Himanen SJ, Blande JD & Klemola T (2010) Birch (*Betula spp.*) leaves adsorb and re-release volatiles specific to neighbouring plants – a mechanism for associational herbivore resistance? New Phytologist 186: 722–732.
- Hori M (1996) Settling inhibition and insecticidal activity of garlic and onion oils against *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae). Applied Entomology and Zoology 31: 605– 612.
- Huang Y, Chen SX & Ho SH (2000) Bioactivities of methyl allyl disulfide and diallyl trisulfide from essential oil of garlic to two species of stored-product pests, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). Journal of Economic Entomology 93: 537–543.
- Isman MB (2000) Plant essential oils for pest and disease management. Crop Protection 19: 603– 608.
- Karban R, Yang LH & Edwards KF (2014) Volatile communication between plants that affects herbivory: a meta-analysis. Ecology Letters 17: 44–52.
- Kaya K, Serce ÇU, Gazel M, Caglayan K & Sauvion N (2016) Potential psyllid vectors of ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ and ‘*Candidatus Phytoplasma pyri*’ in Turkey. Pakistan Journal of Agricultural Sciences 53: 383–392.
- Mann RS, Rouseff RL & Smoot JM (2011) Sulfur volatiles from *Allium spp.* affect Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), response to citrus volatiles. Bulletin of Entomological Research 101: 89–97.
- Marchetti E (2009) Tissue location of resistance in apple to the rosy apple aphid established by electrical penetration graphs. Bulletin of Insectology 62: 203–208.
- Martínez LC, Plata-Rueda A, Zanoncio JC & Serrão JE (2015) Bioactivity of six plant extracts on adults of *Demotispia neivai* (Coleoptera: Chrysomelidae). Journal of Insect Science 15: 34.
- Mobki M, Safavi SA, Safaralizadeh MH & Panahi O (2014) Toxicity and repellency of garlic (*Allium sativum* L.) extract grown in Iran against *Tribolium castaneum* (Herbst) larvae and adults. Archives of Phytopathology and Plant Protection 47: 59– 68.
- Mustafa T, Horton D, Cooper W, Swisher K, Zack R *et al.* (2015) Use of electrical penetration graph technology to examine transmission of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ to potato by three haplotypes of potato psyllid (*Bactericera cockerelli*; Hemiptera: Trioziidae). PLoS ONE 10: e0138946.
- Nerio LS, Olivero-Verbel J & Stashenko E (2010) Repellent activity of essential oils: a review. Bioresource Technology 101: 372–378.
- Ninkovic V, Rensing M, Dahlin I & Markovic D (2019) Who is my neighbor? Volatile cues in plant interactions. Plant Signaling & Behavior 14: e1634993.

- Nottingham SF, Hardie J, Dawson GW, Hick AJ, Pickett JA *et al.* (1991) Behavioral and electrophysiological responses of aphids to host and nonhost plant volatiles. *Journal of Chemical Ecology* 17: 1231–1242.
- Park I-K, Choi K-S & Kim D-H (2006) Fumigant activity of plant essential oils and components from horseradish (*Armoracia rusticana*), anise (*Pimpinella anisum*) and garlic (*Allium sativum*) oils against *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae). *Pest Management Science* 62: 723–728.
- Parker JE, Snyder WE, Hamilton GC & Rodriguez-Saona C (2013) Companion planting and insect pest control. *Weed and Pest Control - Conventional and New Challenges* (ed. by S Soloneski & M Larramendy), pp. 1–30. InTech, Rijeka, Croatia.
- Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P *et al.* (1997) Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry* 46: 597–673.
- Perrin RM & Phillips ML (1978) Some effects of mixed cropping on the population dynamics of insect pests. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 24: 585–593.
- Petrakis EA, Kimbaris AC, Perdikis DC, Lykouressis DP, Tarantilis PA & Polissiou MG (2014) Responses of *Myzus persicae* (Sulzer) to three Lamiaceae essential oils obtained by microwave-assisted and conventional hydrodistillation. *Industrial Crops and Products* 62: 272–279.
- Plata-Rueda A, Martínez LC & Santos MHD (2017) Insecticidal activity of garlic essential oil and their constituents against the mealworm beetle, *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae). *Scientific Reports* 7: 46406.
- Powell G, Tosh CR & Hardie J (2006) Host plant selection by aphids: behavioral, evolutionary, and applied perspectives. *Annual Review of Entomology* 51: 309–330.
- Prado E & Tjallingii WF (1997) Effects of previous plant infestation on sieve element acceptance by two aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 82: 189–200.
- Qubbaj T, Reineke A & Zebitz CPW (2005) Molecular interactions between rosy apple aphids, *Dysaphis plantaginea*, and resistant and susceptible cultivars of its primary host *Malus domestica*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 115: 145–152.
- R Core Team (2019) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Regnault-Roger C & Hamraoui A (1995) Fumigant toxic activity and reproductive inhibition induced by monoterpenes on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera), a bruchid of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Stored Products Research* 31: 291–299.
- Regnault-Roger C, Vincent C & Arnason JT (2012) Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. *Annual Review in Entomology* 57: 405–424.
- Satyral P, Craft J, Dosoky N & Setzer W (2017). The chemical compositions of the volatile oils of garlic (*Allium sativum*) and wild garlic (*Allium vineale*). *Foods* 6: 63.
- Sauge M-H, Lacroze J-P & Poëssel J-L (2002) Induced resistance by *Myzus persicae* in the peach cultivar ‘Rubira’. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 102: 29–37.
- Schröder R & Hilker M (2008) The relevance of background odor in resource location by insects: a behavioral approach. *BioScience* 58: 308–316.
- Sedthapong L, Pongmada D, Peerada D, Wallapa W, Nantana S *et al.* (2020) Efficacy of commercial botanical pure essential oils of garlic (*Allium sativum*) and anise (*Pimpinella anisum*) against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Applied Biology & Biotechnology* 8: 88–92.

- Shah S, Hafeez M, Wu M-Y, Zhang S-S, Ilyas M *et al.* (2020) Downregulation of chitin synthase A gene by diallyl trisulfide, an active substance from garlic essential oil, inhibits oviposition and alters the morphology of adult *Sitotroga cerealella*. *Journal of Pest Science* 93: 1097–1106.
- Shah S, Ma M, Ali A, Kaya M, Li X- G *et al.* (2021) Effects of diallyl trisulfide, an active substance from garlic essential oil, on structural chemistry of chitin in *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 172: 104765.
- Shahriari M & Sahebzadeh N (2017) Effect of diallyl disulfide on physiological performance of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 50: 33–46.
- Therneau T (2019) A Package for Survival Analysis in R. <https://CRAN.R-project.org/package=survival>.
- Therneau TM & Grambsch PM (2000) *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model*. Springer, New York, NY, USA.
- Tjallingii WF (1988) Electrical recording of stylet penetration activities. *Aphids - Their Biology, Natural Enemies and Control, Volume 2B* (ed. by AK Minks & P Harrewijn), pp. 95–108. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Tjallingii WF (1985) Electrical nature of recorded signals during stylet penetration by aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 38: 177–186.
- Tjallingii WF & Esch TH (1993) Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals. *Physiological Entomology* 18: 317–328.
- Tolosa TA, Tamiru A, Midega CAO, van den Berg J, Birkett MA *et al.* (2019) Molasses grass induces direct and indirect defense responses in neighbouring maize plants. *Journal of Chemical Ecology* 45: 982– 992.
- Tripathi AK, Upadhyay S, Bhuiyan M & Bhattacharya PR (2009) A review on prospects of essential oils as biopesticides in insect-pest management. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy* 1: 52– 63.
- Wu M-Y, Ying Y-Y, Zhang S-S, Li X- G, Yan W-H *et al.* (2020) Effects of diallyl trisulfide, an active substance from garlic essential oil, on energy metabolism in male moth *Sitotroga cerealella* (Olivier). *Insects* 11: 270.
- Zhou H, Chen L, Liu Y, Chen J & Francis F (2016) Use of slow-release plant infochemicals to control aphids: a first investigation in a Belgian wheat field. *Scientific Reports* 6: 31552.

Essential oil trunk injection into orchard trees: consequences on the performance and preference of hemipteran pests

Author: Thomas Denoirjean¹, Daphné Belhassen², Géraldine Doury¹, Arnaud Ameline^{1*}, Pierre Yves Werrie³, Marie Laure Fauconnier³, Thierry Hance², Guillaume Jean Le Goff²

1. UMR CNRS 7058 EDYSAN (Écologie et Dynamique des Systèmes Anthropisés), Université de Picardie Jules Verne, 33 rue St Leu, F-80039 Amiens Cedex, France.

2. Earth and Life Institute, Biodiversity Research Centre, UCLouvain, ELIB – Croix du sud 4–5 bte L7.07.04, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

3. Laboratory of Chemistry of Natural Molecules, Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liège, Gembloux, Belgium,

* corresponding author

Abstract

BACKGROUND: Apples and pears are among the most widely cultivated fruit species in the world. Pesticides spray application is a commonly used method in conventional orchards; however, most of it will not reach the target plant, increasing the contamination of non-target organisms. Trunk injection represent an alternative application method and essential oils represent a “green” alternative to pesticides due to their reported insecticidal properties. The aim of this study was to evaluate the impact that the injection of a cinnamon essential oil solution into the trunk of apple and pear trees could have on their respective pests (*Dysaphis plantaginea* and *Cacopsylla pyri*, respectively), both in terms of their feeding behaviour (preference) and their life history traits (performance), but also to evaluate the timing of this effect.

RESULTS: The injection of an essential oil emulsion in trees impacts Hemipteran host-plant colonisation, as for both species a modification of their preference and of their performance was observed. While essential oil injection altered the feeding behaviour of *D. plantaginea* as a significantly lower proportion of aphids ingested phloem sap on injected trees (from 78.6 on the control trees to 26.1% on injected trees), the modification of feeding behaviour of *C. pyri* seems to be more related to modification of peripheral tissues. These changes in the feeding behaviour of the two pests resulted in an increase of their mortality rate, up to 30% for the aphids and 50% for the psyllids.

CONCLUSION: This study show that the tree injection of cinnamon essential oil could theoretically be used to control these two orchard hemipteran pests, but its effectiveness in real conditions still has to be demonstrated.

Key words

Cacopsylla pyri; *Dysaphis plantaginea*; *Cinnamomum cassia*; trunk injection; electrical penetration graph; host-plant selection; biopesticide; *Malus domestica*; *Pyrus communis*

1. Introduction

Apples and pears are among the most widely cultivated fruit species in the world. In 2020, apples were the 4th most important fruit production in terms of number of tons produced in the world, with 87 million tons for a cultivated area of 4.7 million hectare.¹ World pear production was over 23.7 million tons for a cultivated area of over 1.29 million hectares.¹

In conventional apple orchards, the use of chemicals is widespread for the control of several diseases and pests and in particular the apple aphid.² For pear orchards, pest population control is currently mainly based on integrated pest management that also may include the use of synthetic pesticides.^{3,4} Crop protection in apple orchards seems to rely more on pesticides because apple insect pests seem to be less vulnerable to natural enemies or require lower intervention thresholds than for pear pests. However, in recent years, concerns about the environmental risks associated with the use of pesticides, the emergence of pesticide-resistant populations and the increasing public demand for environmentally friendly products have stimulated the research for new solutions to control these orchards pests.⁵

The rosy apple aphid, *Dysaphis plantaginea* (Passerini, 1860), and the pear psyllid, *Cacopsylla pyri* (Linnaeus 1761), are both phloem sap sucking hemipteran insects and are both considered the most important pests of their respective host plant. The *D. plantaginea* aphids cause significant damage, even at low densities, their stings can provoke leaf curling and fruit deformation.⁶ These can lead to important economic losses, with an estimate of 30% to 80% losses when aphid populations are not controlled.^{6,7} The *C. pyri* psyllids can also be responsible for heavy economic losses.⁸ Although they do not cause fruit deformations, their bites disrupt plant growth, and they are vectors of "*Candidatus Phytoplasma pyri*", a phytoplasma responsible for the pear decline disease.^{9,10} Finally, both hemipteran insects produce a large amount of honeydew that favours the development of sooty mold.^{8,11}

Pesticides spray application is a commonly used method in conventional orchards.¹² However, less than 0.1% of sprayed pesticides reach the target pest and between 44 and 71% do not reach the target plant,¹³ increasing the contamination of non-target organisms such as natural predators, pollinators and decomposers. Trunk injection is an alternative method of pesticide application that could reduce risks to beneficials and workers and seems to be particularly well adapted to manage sap feeder pests.^{14,15} Indeed, the pesticide is delivered directly into the tree's vascular system and is absorbed by the xylem sap flow. This method allows the administration of most plant protection products, whether the characteristics of the injected product are compatible (or not) with apoplastic transport to achieve good absorption and minimise phytotoxic effects.¹⁶ This type of application also protects the active substances from UV or external biodegradation as well as increasing their persistence.^{16,17,18} The injection of synthetic chemical pesticides has been shown to be effective in several biological models such as apple tree,¹⁹ avocado tree,²⁰ and date palm.²¹ Furthermore Werrie *et al.*,²² have recently demonstrated that the injection of biopesticides was possible in apple trees and proposed essential oil injection as a possible alternative strategy for pest control.

Essential oils represent a “green” alternative in the agricultural domain due to their reported insecticidal, antimicrobial, antiviral, nematicidal and antifungal properties.²³ They are composed of volatile secondary metabolites characterized by a strong odour. Many of these compounds have ecological functions such as internal messengers, defensive substances, or attractive substances for pollinators and natural enemies of pests.²⁴ Essential oils may contain about 20-60 components, present in different concentrations. There are one to three major components accounting for 20-70% of the oil, which generally determine its biological properties.^{25,26,27} The properties of essential oils result not only from individual molecules, but also from the synergy/additivity between these different components. The effects of the oil are generally attributed to the majority components of the oil, but the trace compounds participate in increasing these effects.

The essential oil used in our study was obtained from *Cinnamon cassia*. Several studies have already underlined its antifeeding and insecticidal effect against insect pests caused by its major compound, the trans-cinnamaldehyde.^{28,29,30}

The aim of this study was therefore to evaluate the impact that the injection of a cinnamon essential oil solution into the trunk of apple and pear trees could have on their respective pests (*D. plantaginea* and *C. pyri*, respectively), both in terms of their feeding behaviour (preference) and their life history traits (performance), but also to evaluate the timing of this effect. Our hypothesis here is that the injection of cinnamon emulsion into the vascular system of trees will alter the feeding behaviour of both aphids and psyllids on the injected trees, resulting in greater mortality or at least a decrease in mass of these insect pests.

2. Material and Methods

2.1. Insect material

The population of *D. plantaginea* (Hemiptera: Aphididae) used in this study was developed from several wild clones collected in 2018 in the experimental orchards of the Proefcentrum voor Fruitteelt, Sint-Truiden-Belgium, while the *C. pyri* (Hemiptera: Psylloidea) psyllid population was initially collected in 2013 in the experimental pear orchard of Proefcentrum voor Fruitteelt, Sint-Truiden-Belgium.

For both *D. plantaginea* and *C. pyri*, standardized mass rearing was performed on their respective host plant obtained by *in vitro* multiplication (*M. domestica* cv. “Jonagold” and *P. communis* cv. “Durondeau”, respectively) in growth chambers under $24\pm 1^\circ\text{C}$, $60\pm 5\%$ RH, and a 16:8 L:D cycle. For both hemipteran species, synchronized first instar nymphs were obtained by placing adult females on plantlets for 48 hours before transferring them to a new plantlet. This protocol allowed us to produce offspring insects of known age/stage on plants.

2.2. Plant material

All the experiments were performed using 40-60 cm high plants with 15 to 30 leaves, obtained by *in vitro* multiplication, *M. domestica* cv. “Jonagold” for apple trees and *P. communis* cv. “Durondeau” for pear trees. Plants were obtained from the “centre wallon de recherche agronomique” (www.cra.wallonie.be).

2.3. Essential Oil

The cinnamon (*C. cassia* J. Presl) essential oil (EO) used in this study was purchased from Pranarôm (Pranarôm & Herbalgem, Ghislenghien, Belgium). Before formulation of the EOs, the oil composition was analyzed by gas chromatography associated with mass spectrometry (GC-MS). These analyses were carried out on a 7890A-5975C GC-MS equipped with an HP-5MS 30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm capillary silica column (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, United States). The operating conditions were the following: helium flow of 1.0 ml min⁻¹; the oven temperature was programmed at 40°C for 2 min, increased to 100°C at a rate of 5°C min⁻¹, increased to 120°C at a rate of 3°C min⁻¹, held for 3 min, increased to 220°C at a rate of 5°C min⁻¹, and finally increased to 310°C at a rate of 15°C min⁻¹. One microliter of a 1 mg ml⁻¹ EO solution in hexane (HPLC grade, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was injected in splitless mode. The injector, quadrupole and MS temperatures were 250, 150, and 230°C, respectively. The mass spectrometer (MS) ran in electron impact (EI) mode at an electron energy of 70 eV. Mass spectra were acquired in the range of 30–400 atomic mass units

(amu). GC-MS analysis of the essential oil demonstrated that *C. cassia* oil was composed of 79.49% *trans*-cinnamaldehyde. The detailed composition can be found in the Supplementary Table 1.

2.4. Essential oil emulsion

To facilitate injection and diffusion of EOs in the tree vascular tissue, a water-soluble, stable, and homogenous EO emulsion was prepared as described in Werrie *et al.*²² To prepare 100 ml of the 1% (v/v) EO/water emulsion, 2 ml of Tween 80 (CAS 9005-65-6, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and 20 ml of 100 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Titriplex III, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) solutions were added into 15 ml of water under constant agitation at 1,250 rpm. Water was then added to bring the final volume to 100 ml. After 5 min under constant agitation, the solution was then stabilized by high-speed homogenisation for 6 min at 9,500 rpm (Ultra-Turrax T25, IKA WERKE, Staufenim Breisgau, Germany) and by high-pressure homogenisation with eight cycles at 5,000 psi (FMC, Philadelphia, United States). The emulsion particle sizes distribution was analyzed with a particle sizer (Beckman Coulter Delsa™ Nano C Particle Analyser, California, United States) and is presented in Supplementary Figure 1 (mean distribution=59.31 ±0.69 nm).

2.5. Trunk injection procedure

The trunk injection procedure was adapted from Werrie *et al.*²² First, a single needle (L:10 mm, Ø: 0.4 mm) was used to pierce the plant stem to the xylem at 2 cm from the bottom of the stem. Another needle (L:10 mm, Ø: 0.4 mm) (Venofix®) connected by a tube (L:300 mm) to a plastic pocket containing 10mL of emulsion was then inserted into the hole previously made. Hot glue was then applied with a gun to hold the needle in place. Aluminium foil was placed around the plastic pocket to protect the emulsion from light. The device was then left in place for 24 hours. To estimate the amount of emulsion ultimately injected in the plant, the plastic pocket was weighed before and after the 24 hours of passive injection. Only trees that had received more than 0.02g of emulsion were selected for the experiments.

2.6. Aphid and psyllid preference

The preference through feeding behavior was studied using the electrical penetration graph (EPG) method.³¹ An electrode consisting of a 2-cm long copper wire soldered to the head of a 2.2 mm diameter brass nail was used to wire the insects. The other end of the electrode consisted of a thin 20 µm diameter and 2-cm long gold wire glued to the copper wire portion of the electrode. A droplet of conductive water-based silver glue was used to attach the gold wire to the copper wire of the electrode, and another was deposited on the abdomen of individual

aphids/psyllids to attach them to the extremity of the gold wire. Gold wire and silver glue were provided by EPG systems, Wageningen, Netherlands. Eight individual insects were connected to the Giga-8 DC-EPG amplifier (provided by EPG systems, Wageningen, Netherlands), each being placed on the leaf of an individual plant as described in Denoirjean *et al.*³² for aphids and Civolani *et al.*⁹ for psyllids. The recordings were performed continuously for 8 h during the photophase inside a Faraday cage. The EPG data were digitized using a DatQ Instruments DI-710-UH analog-to-digital (A-D) board and recorded using the Stylet⁺ software (EPG Systems, Wageningen, Netherlands), at a sample rate of 100 Hz, input impedances (R_i) of $10^9 \Omega$, and DC substrate voltage. Analysis of the EPG waveforms were carried out using the Stylet⁺ software. Parameters from the recorded waveforms were calculated with the EPG-Calc 6.1.7 software.³³ They were based on different EPG waveforms, described by Tjallingii and Esch for aphids,³⁴ and Civolani *et al.* for psyllids,⁹ and corresponded to: (Pr) stylet activity within plant tissues; (C) stylet pathways in plant tissues except phloem and xylem; (E1) salivation in phloem elements; (E2) passive phloem sap ingestion; (G) active xylem sap ingestion; and (F) derailed stylet mechanics (the latter being described only in aphids).

In order to assess the suitability of essential oil injection for crop protection, the EPG experiments were first conducted on non-injected trees (blank treatment, no injection; named “control”), and then on the same trees after the essential oil injection, directly after the 24 hours of passive injection (named “D0”) and five days after the end of the passive injection (named “D5”). A total of 28 and 21 plants were used for the EPG measurements for aphids and psyllids, respectively. EPG records were obtained from 28 aphids and 19 psyllids on control trees, from 28 aphids and 18 psyllids on D0 injected trees and from 23 aphids and 21 psyllids on D5 injected trees. However, to ensure that the effects observed were truly due to the essential oil and not to the piercing and/or the emulsifying solution alone, feeding behavior of aphids and psyllids was compared when feeding on non-injected trees (blank treatment, no injection; named “control”) and trees injected with the solution without the EO (negative control: emulsion devoid of EOs; named “injected control”). EPG records were obtained from 29 aphids and 19 psyllids on control trees and from 29 aphids and 20 psyllids on injected control trees.

2.7. Aphid and psyllid performance

To measure the impact of tree injection on aphids or psyllids survival, one clip-cage adapted from MacGillivray and Anderson,³⁵ and containing five synchronized first instar individuals was installed on a top leaf of an apple or pear tree that had been either injected with the cinnamon 1% essential oil emulsion (HE modality) or not injected (Control modality). Ten trees were used per modality. For each clip-cage, the number of alive and dead individuals was assessed every 24 hours for 10 days. At the end of the experiment, all the surviving individuals were weighed using an electronic precision balance (Mettler MT5, Max: 3g Low: 0.1mg). An average weight of the surviving individuals was then calculated for each clip-cage.

Performance experiments were carried out for both hemipteran insects, on non-injected trees (named “Control”), or on trees injected with the 1% cinnamon essential oil emulsion (named “HE”).

2.8. Statistical analysis

Regarding aphids and psyllids feeding behaviour, data on EPG parameters describing the number of occurrences of a particular phase (e.g. “n_Pr”) were not normally distributed (count data), accordingly a GLM was carried out using Poisson distribution. EPG data on feeding phase durations (e.g. duration of phloem sap ingestion “s_E2”) were not normally distributed, so a GLM using a Gamma (link = “inverse”) distribution was carried out. The time to first probe (t.1Pr) was tested using a Cox proportional hazards (CPH) regression model, which is adapted to treat time-dependent parameters. The assumption of validity of proportional hazards was validated using the function “coxph” (package R: “survival”, version 3.1.8: <https://github.com/therneau/survival>).

Generalized linear models (GLMs) were fitted to the data to test for the potential influence of trunk injection and time on aphids or psyllids survival (Poisson distribution). Mann-Whitney tests were also used to compare the weight of surviving individuals (aphids and psyllids) at the end of the performance experiments between the control and injected trees.

Statistical analyses were performed using R version 4.1.0 R Core Team 2016 for Statistical Computing for Windows. All tests were applied using two-tailed hypotheses and significance level was set at 0.05.

3. Results

3.1. Aphid and psyllid preference

Aphids on D0 and D5 injected apple trees had a significantly shorter total duration of stylet probing (s_Pr), that lasted around 200 minutes, compared to aphids on control trees that lasted around 280 minutes (GLM using Gamma distribution, $\chi=13.67$, $p=0.001$) (Figure 1). No significant difference was observed for the number of probes (n_Pr) (GLM using Poisson distribution, $\chi=1.61$, $p=0.45$). Aphids submitted to the D5 injected trees had a significantly greater time before the first probing (t.1Pr) (60 minutes) compared to that of aphids submitted to controls (30 minutes)(CPH, $\chi=6.35$, $p=0.04$).

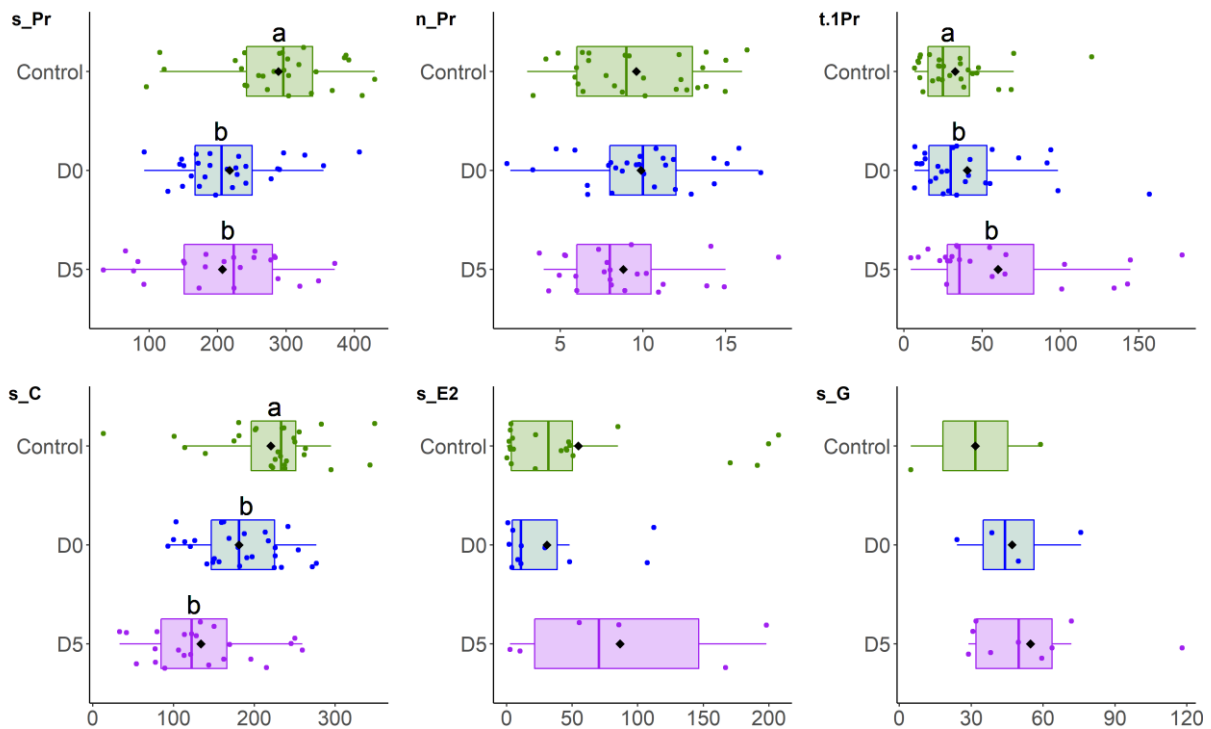


FIGURE 1 Feeding behaviour parameters of *D. plantaginea* adults submitted to control apple trees (green) or D0 (blue) and D5 (purple) injected trees. (s_Pr) Total duration of probing; (n_Pr) Number on stylet probes; (t.1Pr) Time to first probe (s_C); Total duration of pathway phase; (s_E2) Total duration of phloem sap ingestion and (s_G) Total duration of xylem sap ingestion. Box plots show median (line) and 25–75% percentiles (box). Black dots show means. Different letters indicate significant differences, and an absence of letter indicate that no significant difference was observed between the treatment.

Aphids on D5 injected trees had a significantly shorter total duration of pathway phase (s_C) compared to aphids on D0 injected trees (GLM using Gamma distribution, $\chi=22.87$, $p<0.001$). Indeed, aphids on the D5 injected trees performed pathway phase for *ca.* two hours, whereas on controls or D0 injected trees, aphids performed pathway phase for at least three hours.

Regarding phloem sap ingestion (s_E2), while no difference was observed for the total duration (GLM using Gamma distribution, $\chi=2.81$, $p=0.25$), a significant lower proportion of aphids did ingest phloem sap on both D0 and D5 injected trees compared to aphids on controls (χ^2 test, $\chi=15.68$, $p<0.001$). As shown on Figure 2, *ca.* 80% of the aphids on non-injected trees ingested phloem sap, while only *ca.* 40% and *ca.* 25% of aphids submitted to D0 and D5 injected trees, respectively, ingested phloem sap.

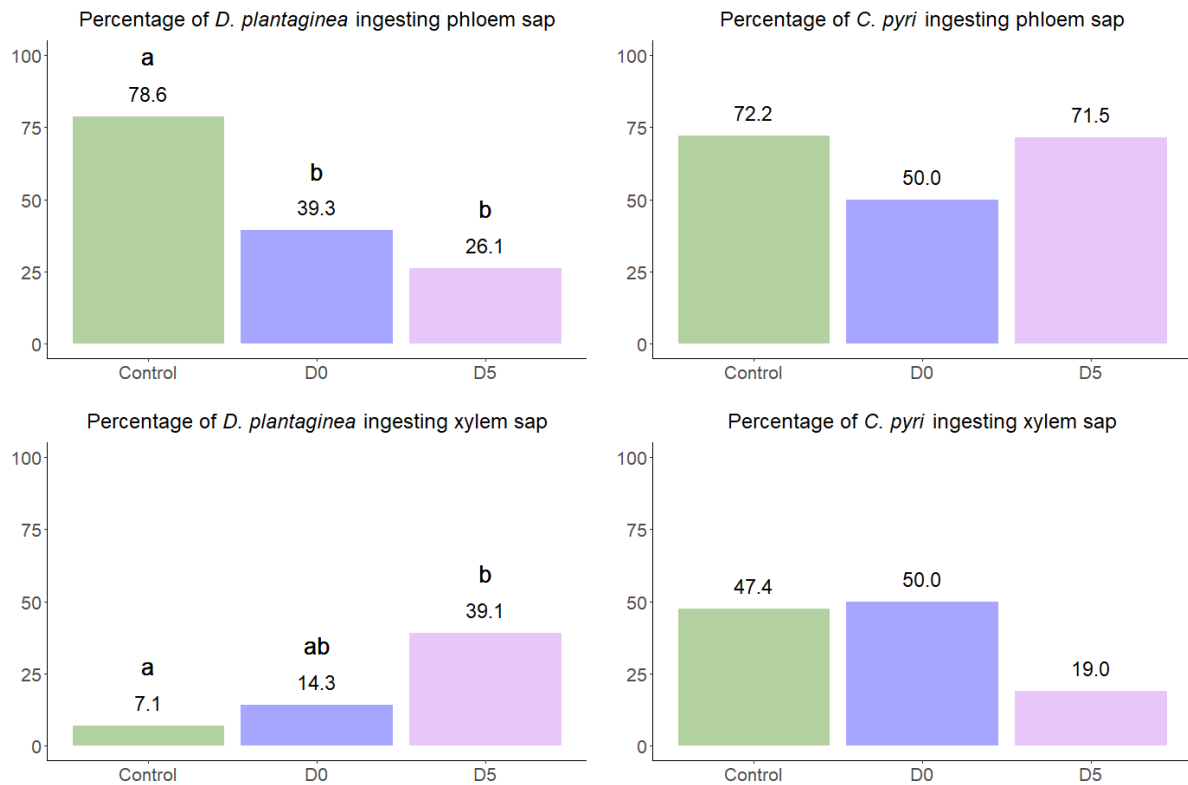


FIGURE 2 Percentages of *D. plantaginea* and *C. pyri* ingesting phloem or xylem sap on control trees (green), or D0 (blue) and D5 (purple) injected trees. Different letters indicate significant differences, and an absence of letter indicate that no significant difference was observed between the treatment.

Finally, no difference was observed for the total duration of xylem sap ingestion (s_G) (GLM using Gamma distribution, $\chi=1.26$, $p=0.53$), but a significant greater proportion of aphids did ingest xylem sap on injected trees five days after injection compared to controls (χ^2 test, $\chi=9.02$, $p=0.01$). *Ca.* 7% of the aphids on control trees ingested xylem sap, while *ca.* 40% aphids submitted to D5 injected trees ingested phloem sap (Figure 2). More preference parameters are detailed in the supplementary material in the Supplementary tables 1.

For psyllids, the total duration of stylet probing (s_{Pr}) lasted around 400 minutes and no significant difference was observed between treatments (GLM using Gamma distribution, $\chi=5.11$, $p=0.08$) (Figure 3). Psyllids on injected trees performed a greater number of probes (n_{Pr}), as controls did *ca.* 4 probes whereas psyllids on D0 and D5 injected trees performed *ca.* 6 and 7 probes, respectively (GLM using Poisson distribution, $\chi=15.20$, $p<0.001$). Psyllids submitted to the D0 and D5 injected trees had a greater time before the first probing (t_{1Pr}) compared to psyllids on controls (CPH, $\chi=6.23$, $p=0.04$), *ca.* 25 and *ca.* 9 minutes respectively. No difference was observed in terms of total duration of pathway phase (s_C) (GLM using Gamma distribution, $\chi=0.72$, $p=0.70$). Regarding phloem sap ingestion (s_{E2}), while no difference was observed for both the total duration (GLM using Gamma distribution, $\chi=0.79$,

$p=0.67$) and proportion of psyllids performing this phase (χ^2 test, $\chi=2.19$, $p=0.33$) (Figure 2). Finally, no difference was observed for the total duration of xylem sap ingestion (s_G) (GLM using Gamma distribution, $\chi=2.69$, $p=0.26$) or for the proportion of psyllids ingesting xylem sap (χ^2 test, $\chi=5.01$, $p=0.08$) (Figure 2). More preference parameters are detailed in the supplementary material in the Supplementary tables 2 and 3. There was no impact of the injection of the emulsion solution on the feeding behavior of aphids and psyllids when compared to aphids and psyllids on control (non-injected trees) (Supplementary tables 4 and 5).

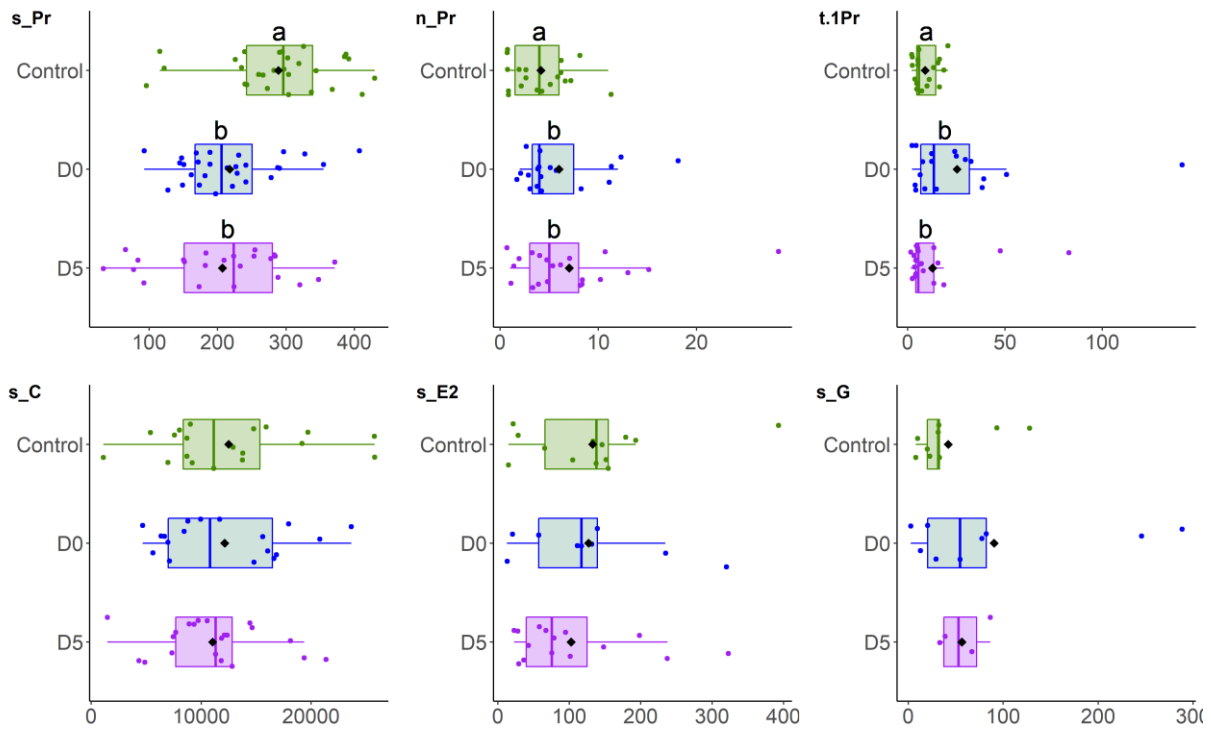


FIGURE 3 Feeding behaviour parameters of *C. pyri* adults submitted to control pear trees (green), or D0 (blue) and D5 (purple) injected trees. (s_Pr) Total duration of probing; (n_Pr) Number on stylet probes; (t.1PR) Time to first probe (s_C); Total duration of pathway phase; (s_E2) Total duration of phloem sap ingestion and (s_G) Total duration of xylem sap ingestion. Box plots show median (line) and 25–75% percentiles (box). Black dots show means. Different letters indicate significant differences, and an absence of letter indicate that no significant difference was observed between the treatment.

3.2. Aphid and psyllid performance

For both insects, our results showed that trunk injection (*D. plantaginea*: $X^2 = 263.1$, $df = 1$, $P < 0.001$; *C. pyri*: $X^2 = 236.93$, $df = 1$, $P < 0.001$) and duration (*D. plantaginea*: $X^2 = 191.97.1$, $df = 1$, $P < 0.001$; *C. pyri*: $X^2 = 199,56$, $df = 1$, $P < 0.001$) significantly affected the individuals survival. Indeed, for *D. plantaginea*, from day 5 to day 8, there were fewer survivors on the

treated trees (around 3) than on the controls where all the individuals had survived, then after day 8 survival became equivalent between treated and untreated trees (Figure 4A). For *C. pyri*, from day 2, survival was greater on the controls with *ca* 4 surviving individuals on average, while on injected trees it was *ca* 2 individuals, and this difference was kept until the end of the experiment (Figure 4B).

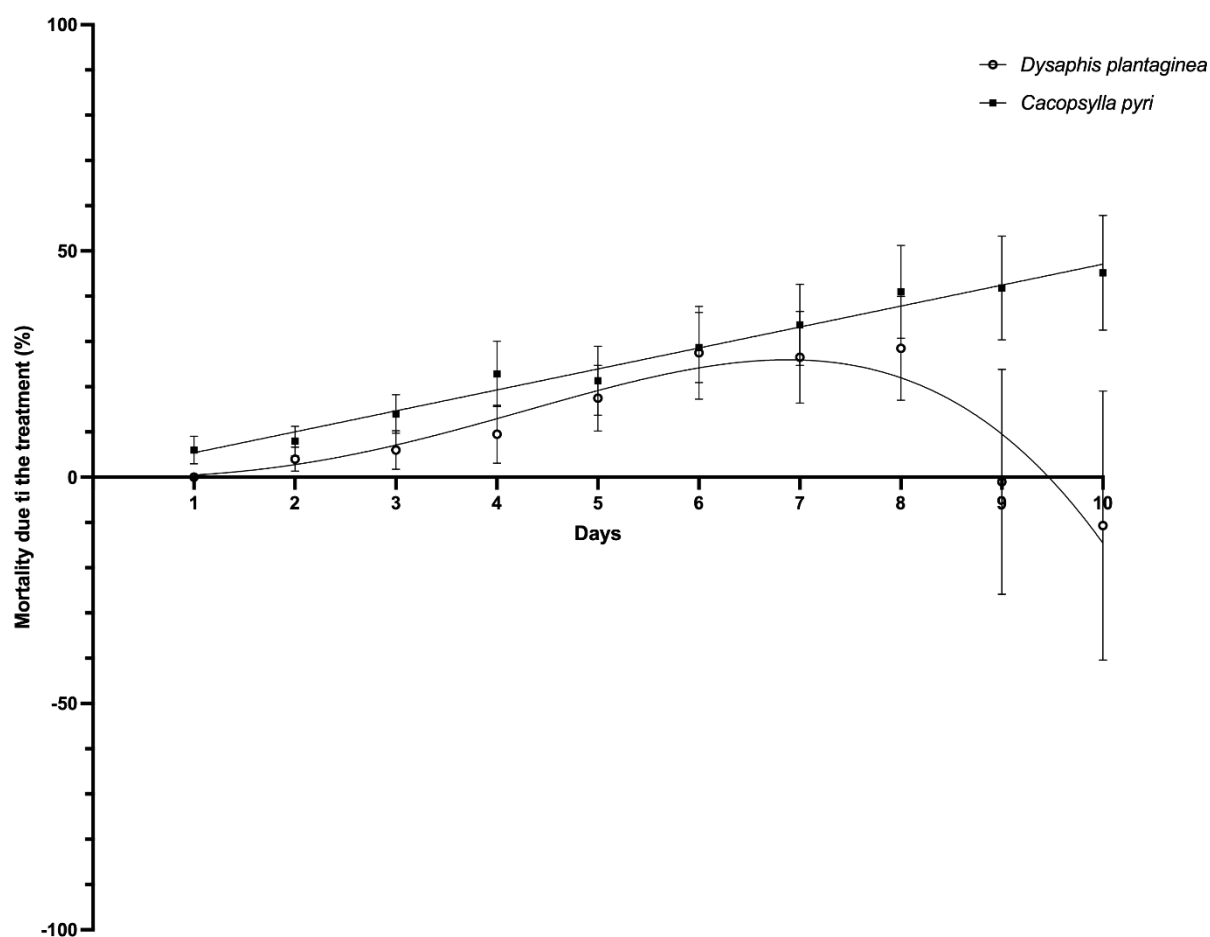


FIGURE 4 Dynamics of mortality rate due to treatment for *Dysaphis plantaginea* and *Cacopsylla pyri*. Error bars indicate standard error bars according to GLM analysis (n=10)

Regarding the final weight of surviving individuals, no difference was observed between the two tested modalities, either for the aphids ($U = 33.50$, $P > 0.05$) or the psyllids ($U = 25.00$, $P > 0.05$). The average weight of *D. plantaginea* and *C. pyri* at the end of the experiment was *ca* 120 μ g and 236 μ g respectively.

4. Discussion

The results obtained in our study confirmed our hypotheses. Indeed, the injection of an essential oil emulsion in trees impacts host-plant colonization by Hemiptera, as for both species a modification of their preference and performance was observed.

Concerning *D. plantaginea*, we observed that the injection of a 1% cinnamon essential oil emulsion in the host plant trunk induced a disturbance of aphid feeding behaviour. Indeed, the injection of cinnamon essential oil emulsion shortened the duration and increased the latency time of stylet probing, while their number remained similar for all modalities. Short probing duration indicates the presence of negative factors in the epidermis and/or mesophyll, which cause the stylets to withdraw.^{36,37,38,39,40} The longer latency time seems to indicate that the aphids were reluctant to probe. Knowing that they were restricted to a limited space, due to our experimental set-up, this suggests that they might have looked for another place to feed if they had not been constrained.^{39,40} This increase in latency time of the first probe could be due to a surface repellent effect causing plant rejection prior to stylet insertion.^{36,39,40,41} In our experiment, a likely explanation could be a change in the olfactory information from the plant, caused directly or indirectly by the presence of the essential oil. However, Werrie *et al.*²² also injected cinnamon essential oil into apple tree and showed that trans-cinnamaldehyde, the major compound in cinnamon essential oil, was not found in the VOC of the injected apple trees. Another possibility is a change in VOCs emitted by the plant due to stress induced by trunk injection via the activation of systemic acquired resistance (SAR).⁴² Werrie *et al.*,²² showed that the injury caused by an injection did not cause a change in VOCs, the effect of the trunk injection on this phase would therefore be rather due to a triggering of the plant's defence systems, due to the injection of essential oil which would act as an elicitor.

Furthermore, the results of the feeding behaviour experiments revealed that the injection of the emulsion without EO had no impact in comparison with the non-injected control, thus the piercing of the trunk and the injection of the emulsifier did not seem to have deeply or visibly altered the physiology of the plant. This is in accordance with the results of Werrie *et al.*²² which showed, with the same modalities (only on apple trees), that the emission of VOCs and the photosynthetic capacity remain unchanged.

Werrie *et al.*,²² also showed that higher quantities of a series of sesquiterpenes (caryophyllene, germacrene, α -farnesene, bergamotene and (E,E)-4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraene (TMTT)), as well as monoterpenes (terpinen-4-ol and linalool), and (E)-4,8-dimethylnonatriene (DMNT), were emitted from apple trees injected with cinnamon essential oil. These compounds could be the cause of the behavioral change we recorded here, as several studies have shown their repulsive or toxic effect on several aphid species.^{43,44} Beside this suggested impact on volatiles metabolites, an experiment regarding plant defence elicitation using qRT-PCR on major apple defence pathways highlighted an increased gene expression following cinnamon EO application similar to SAR-inducer bion.⁴⁵ Moreover prolonged induction of

genes from pathogenesis-related proteins, parietal modification and phenylpropanoids pathway were observed. Metabolites from the phenylpropanoid pathways hydroxycinnamic acids, particularly 4-caffeoylquinic acid (4-CQA) and 4-p-coumaroylquinic acid (4-pCoQA), were identified as the major players in *D. plantaginea*-resistant apple cultivars.⁴⁶ Therefore, studying activation of the plant defence mechanism by the cinnamon EO, as well as evaluating the timing of this effect and specific secondary metabolites production, such as VOCs, hydroxycinnamic acids or dibenzofurans could clarify the physiological cause leading to *D. plantaginea* mortality. The fact that a difference was observed at D5 and not at D0 suggests that this effect took time to develop. If the activation of the plant's defence systems was indeed the cause of the effect observed at D5, then this may explain the lack of effect at D0, as there was a lag period between the injection and the release of the volatile substances.⁴⁷ In addition to the development of biopesticides with direct (insecticidal) and indirect toxic properties on aphids (by stimulating defence mechanisms), investigating the roles of these metabolites in insect-plant interactions could assist in the development of targeted plant breeding.

The injection also induced a decrease in the search time in the mesophyll. These results are quite surprising since Werrie *et al.*²² found that trans-cinnamaldehyde of treated trees accumulated in the leaves, and that the amounts of other repellent or insecticidal compounds such as caryophyllene significantly increased in the leaves. It would be interesting to carry out a histological study to determine where these compounds can be found in the leaf, and whether they are found in the punctured cells. Dancewicz *et al.*,³⁷ using aphids as sensors, have indirectly demonstrated that exogenous volatiles may penetrate the plant cuticle and epidermis, and pass into deeper tissue layers.

The higher proportion of individuals ingesting xylem in injected trees was a sign that the aphids were suffering from water stress which is increased by starvation.^{48,49,50} Moreover, the injection system used in the present study allowed the emulsion to reach the leaves via the xylem. The fact that the aphids ingested more xylem on the injected trees, combined with the toxic effects observed, would therefore reinforce the idea that the mortality observed in our experiments was not due to the presence of the essential oil itself but rather to a reaction of the plant.

In our study, there was no significant difference between the proportion of individuals performing a stylet derailment phase (F) between treated and untreated trees. As this phase indicates a mechanical resistance of the plant tissues,⁵¹ this suggests that either there was no increase in this mechanical resistance, or the aphids were not exposed to it, or were not sensitive to it.

The EPG results allow a better understanding of the results of the experiment on population dynamics. For aphids, the results for survival show an effect of the injection, with a lower survival on treated trees. These results are consistent with the EPG data, the absence of phloem sap ingestion led to aphid death by starvation. On the other hand the presence of toxic compounds in the phloem, as suggested by the increased salivation recorded, could have led to death by intoxication. We observed a significant difference in survival from the fifth day. This

difference coincides with the EPG observations and corresponds to the time when an increase in time to first probing, a decrease in probing time in the mesophyll and a decrease in total salivation time were observed.

For psyllids, their feeding behaviour was little changed on the treated trees compared to controls since only their probing behaviour was affected (number and latency time). Psyllids honeydew plays an important role in the ecology of these insects as it is used as a defence against predators,⁵² and parasitoids.^{5,53} It is therefore possible that the psyllids need to feed on the plant to produce this protection, even if the plant has been stressed by the injection and does not correspond to a perfect host.

The survival profile of psyllids was the same as for aphids with a significantly higher mortality from the third day onwards. The fact that the feeding behaviour of the psyllids was little changed compared to the control condition suggests that the observed mortality was exclusively due to intoxication.

For the mass, there was no difference between the two modalities for either aphids or psyllids. This can be explained by the fact that only the individuals remaining at the end of the experiment, i.e. those that resisted the injection, were weighed. If they resisted the injection treatment, then their diet may not have changed, or may have changed only slightly, and therefore their mass may not have changed either.

5. Conclusion

In this study, we showed that the injection of cinnamon essential oil into the trunk of apple and pear trees resulted in changes in the feeding behaviour of their respective pests and ultimately increased their mortality rate. This method could therefore theoretically be used to control these two orchard hemipteran pests, although its effectiveness in real conditions still has to be demonstrated.

Acknowledgments

GJLG was supported by the grant D31-1394 of the Walloon Region. This work was also supported by the project PROVERBIO (Protection of orchards by biological control: an adapted selection of auxiliaries) financed by the European Union, under the scope of the FEDER program and INTERREG initiative: Programme 2014 - 2020 INTERREG V-A Belgium - France (France - Wallonie - Vlaanderen). Françoise Dubois is thanked for her technical assistance. We thank Marie-Pierre Boley for her help with the administrative tasks. This publication is number BRC 388 of the Biodiversity Research Centre.

Conflict of Interest Declaration

The authors of this article do not present any conflict of interest.

Supplementary material

SUPPLEMENTARY TABLE 1 Cinnamon EO (*Cinnamomum cassia* J.Presl batch:CCB14) molecular profile, provided by Pranarôm

Retention time (min)	Compound name	Relative area (%)
7,3	α -PINENE	0,08
7,4	α -THUYENE	0,01
8,7	CAMPHENE	0,05
9,1	HEXANAL	0,01
10,1	β -PINENE	0,03
14,1	LIMONENE	0,04
14,5	1,8-CINEOLE	0,02
17,2	STYRENE	0,17
18	p-CYMENE	0,06
18,7	TERPINOLENE	0,01
21,9	METHYL-5-HEPTENE-2-ONE	0,01
25,5	NONANAL	0,02
26,2	BENZYL COMPOUND	0,02
29,8	SESQUITERPENE	0,01
30,2	SESQUITERPENE	0,02
30,3	δ -ELEMENE	0,01
31	CYCLOSATIVENE + ISOLEDENE	0,12
31,2	YLANGENE	0,06
31,8	α -COPAENE	0,8
32,9	AROMATIC COMPOUND	0,04
33,3	CAMPHRE	0,04
33,6	BENZALDEHYDE	1,14
33,8	β -BOURBONENE	0,02
36,8	LINALOL	0,04
37,6	SESQUITERPENE	0,05
37,9	α -trans-BERGAMOTENE	0,04
38,2	β -CARYOPHYLLENE	0,12
38,5	TERPINENE-4-OL	0,04
38,8	AROMADENDRENE	0,03
40,6	AROMATIC COMPOUND	0,14
41,1	ACETOPHENONE	0,08
41,3	AROMATIC COMPOUND (Mw=132)	0,14
41,8	ALLO-AROMADENDRENE	0,12
42,6	α -HUMULENE + ESTRAGOLE	0,04
43	SALICYLIC ALDEHYDE	0,69
43,8	γ -MUUROLENE	0,14
44,2	BORNEOL	0,3
44,4	α -TERPINEOL + LEDENE	0,08
46	α -MUUROLENE	0,08
46,2	β -BISABOLENE	0,13
47,7	2-METHYL BENZOFURANE	0,4

47,9	δ-CADINENE + γ-CADINENE	0,29
48,3	METHYL SALICYLATE	0,09
49	BENZENEPROPANAL	0,78
49,2	α-CURCUMENE	0,09
49,5	α-trans-BISABOLENE	0,05
50,2	AROMATIC COMPOUND	0,04
50,8	AROMATIC COMPOUND	0,03
51,1	2-PHENYLETHYLE ACETATE	0,03
51,8	Trans-ANETHOL	0,02
52,1	CALAMENENE	0,03
52,9	HEXANOIC ACID	0,03
53,5	PHENOLIC COMPOUND	0,12
54,4	BENZYL ALCOHOL	0,27
55,4	Z-CINNAMALDEHYDE	0,34
56,3	PHENYLETHYLIC ALCOOL	0,98
58,5	AROMATIC COMPOUND	0,05
59,1	2-METHOXY BENZALDEHYDE	0,42
60,2	CARYOPHYLLENE OXIDE	0,05
63,5	E-CINNAMALDEHYDE	79,49
63,8	AROMATIC COMPOUND (Mw=206)	2,46
65,4	2-METHOXYPHENYLACETONE	0,24
67,4	SPATHULENOL	0,1
68,8	CINNAMYL ACETATE	0,46
69,5	EUGENOL	0,04
69,8	TRIMETHYL PENTADECANONE	0,02
70,5	T-CADINOL	0,02
71,3	SANDARACOPIMARADIENE ISOMERE	0,03
72,1	α-BISABOLOL	0,05
72,3	SESQUITERPENOL	0,03
72,6	α-CADINOL	0,02
74,4	2-METHOXY-CINNAMALDEHYDE	0,04
75,1	CINNAMIC ALCOOL	0,13
75,7	CARYOPHYLLA-3,7-DIEN-6-OL	0,02
78,4	SESQUITERPENIC EPOXIDE	0,07
82,2	Trans-o-METHOXY CINNAMALDEHYDE	5,26
82,6	COUMARINE (Mw=146)	2,1
90,3	BENZYL BENZOATE	0,07
93,8	AROMATIC COMPOUND	0,04
99,5	AROMATIC COMPOUND	0,14
	TOTAL	99,99

SUPPLEMENTARY TABLE 2 Feeding phases (mean \pm standard error of the mean) of *Dysaphis plantaginea* feeding on non-injected trees (named “control”), on trees after the essential oil injection, directly after the 24 hours of passive injection (named “D0”) and five days after the end of the passive injection (named “D5”).

Parameter	p value	χ^2	Control	D0	D5
General probing behavior phase			(n=28)	(n=28)	(n=23)
Total duration of probing (s_Pr) (min)	0.001	13.67	288.82 \pm 15.83 a	217.47 \pm 13.81 b	206.96 \pm 19.50 b
Number of probes (n_Pr)	0.45	1.61	9.61 \pm 0.70	9.89 \pm 0.68	8.83 \pm 0.70
Mean duration of probing events (a_Pr) (min)	0.39	1.87	37.53 \pm 5.34	30.24 \pm 6.90	26.52 \pm 3.78
Time to first probe (t.1Pr) (min)	0.04	6.35	32.73 \pm 4.67 a	40.45 \pm 6.59 ab	60.10 \pm 10.26 b
Pathway phase					
Total duration of pathway phase (s_C) (min)	< 0.001	22.87	220.53 \pm 13.14 a	181.02 \pm 9.94 a	134.02 \pm 13.56 b
Mean duration of pathway phase (a_C) (min)	0.30	2.40	13.69 \pm 0.81	14.92 \pm 0.94	12.73 \pm 1.21
Phloem phase			(n=27)	(n=17)	(n=11)
Total duration of salivation in phloem vessel (s_E1) (min)	0.13	4.10	5.60 \pm 0.75	4.97 \pm 1.37	2.66 \pm 1.01
% of individuals ingesting phloem sap	< 0.001	15.68	78.57 % a	39.29 % b	26.09 % b
Total duration of phloem sap ingestion (s_E2) (min)	0.25	2.81	54.76 \pm 15.00	30.81 \pm 12.49	86.49 \pm 33.03
Other phases			(n=8)	(n=10)	(n=12)
Total duration of stylet derailment (s_F) (min)	0.32	2.27	49.64 \pm 14.08	34.83 \pm 5.77	51.56 \pm 8.82
Total duration of xylem sap ingestion (s_G) (min)	0.53	1.26	31.76 \pm 27.04	47.03 \pm 10.93	54.73 \pm 10.18

The letters within a row indicate significant differences associated with pairwise comparisons using estimated marginal means. P values are associated with GLM models, using Poisson distribution for the number of feeding phases and Gamma distribution for the mean and total duration of feeding phases, Cox models for the “time to first probe” parameter, and χ test for the % of individuals ingesting phloem and xylem sap (degree of freedom = 2 for each test).

SUPPLEMENTARY TABLE 3 Feeding phases (mean \pm standard error of the mean) of *Cacopsylla pyri* feeding on non-injected trees (named “control”), on trees after the essential oil injection, directly after the 24 hours of passive injection (named “D0”) and five days after the end of the passive injection (named “D5”).

Parameter	p.value	χ^2	Control	D0	D5
General probing behavior phase			(n=19)	(n=18)	(n=21)
Total duration of probing (s_Pr) (min)	0.08	5.11	437.62 \pm 12.55	393.82 \pm 12.73	403.00 \pm 15.94
Number of probes (n_Pr)	< 0.001	15.20	4.16 \pm 0.66 a	6.00 \pm 1.02 b	7.05 \pm 1.35 b
Mean duration of probing events (a_Pr) (min)	0.04	6.66	202.19 \pm 39.85 a	96.51 \pm 13.92 b	128.84 \pm 30.55 ab
Time to first probe (t.1Pr) (min)	0.04	6.23	8.93 \pm 1.39 a	25.34 \pm 7.62 b	12.73 \pm 4.12 ab
Pathway phase					
Total duration of pathway phase (s_C) (min)	0.70	0.72	208.18 \pm 25.14	202.39 \pm 22.58	184.00 \pm 17.79
Mean duration of pathway phase (a_C) (min)	0.06	5.66	33.23 \pm 7.32	17.83 \pm 3.92	19.48 \pm 3.37
Phloem phase			(n=18)	(n=17)	(n=21)
Total duration of salivation in phloem vessel (s_E1) (min)	0.10	4.54	125.36 \pm 15.19	87.49 \pm 18.30	134.82 \pm 14.78
			(n=13)	(n=9)	(n=15)
% of individuals ingesting phloem sap	0.33	2.19	72.22 %	50.00 %	71.48 %
Total duration of phloem sap ingestion (s_E2) (min)	0.67	0.79	132.66 \pm 27.35	127.22 \pm 33.07	102.82 \pm 22.63
Other phases			(n=9)	(n=9)	(n=4)
Total duration of xylem sap ingestion (s_G) (min)	0.26	2.69	42.05 \pm 13.59	90.38 \pm 34.80	56.41 \pm 12.45
% of individuals ingesting xylem sap	0.08	5.01	47.37 %	50.00 %	19.05 %

The letters within a row indicate significant differences associated with pairwise comparisons using estimated marginal means. P values are associated with GLM models, using Poisson distribution for the number of feeding phases and Gamma distribution for the mean and total duration of feeding phases, Cox models for the “time to first probe” parameter, and χ test for the % of individuals ingesting phloem and xylem sap (degree of freedom = 2 for each test).

SUPPLEMENTARY TABLE 4 Feeding phases (mean \pm standard error of the mean) of *Dysaphis plantaginea* feeding on non-injected trees (named “control”) and on trees after injection of the emulsion solution without essential oil (named “injected control”).

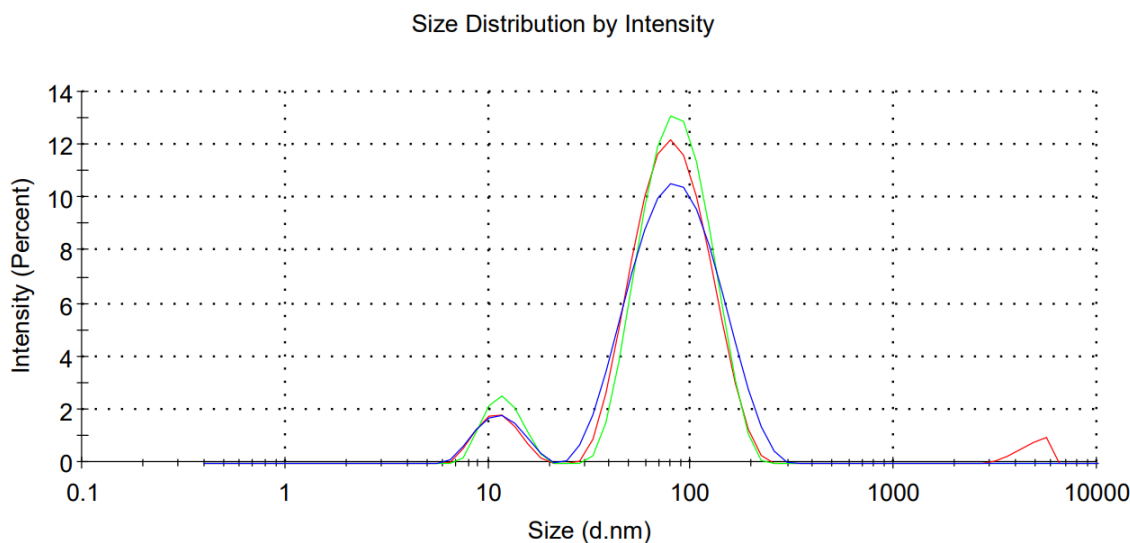
Parameter	p value	χ^2	Control (n=29)	Injected Control (n=29)
General probing behavior phase				
Total duration of probing (s_Pr) (min)	0.18	1.78	316.48 \pm 14.81	282.74 \pm 19.89
Number of probes (n_Pr)	0.053	3.73	9.83 \pm 0.92	11.48 \pm 1.69
Mean duration of probing events (a_Pr) (min)	0.52	0.41	56.16 \pm 13.50	46.03 \pm 9.15
Time to first probe (t.1Pr) (min)	0.57	0.32	37.40 \pm 7.34	32.36 \pm 6.44
Pathway phase				
Total duration of pathway phase (s_C) (min)	0.09	2.81	209.70 \pm 14.91	173.78 \pm 15.06
Mean duration of pathway phase (a_C) (min)	0.77	0.09	16.32 \pm 2.23	15.48 \pm 1.76
Phloem phase				
Total duration of salivation in phloem vessel (s_E1) (min)	0.13	2.22	18.68 \pm 3.46	12.53 \pm 2.04
			(n=16)	(n=14)
% of individuals ingesting phloem sap	0.79	0.07	55.17 %	48.28 %
Total duration of phloem sap ingestion (s_E2) (min)	0.86	0.35	49.57 \pm 11.00	69.26 \pm 13.96
Other phases				
Total duration of stylet derailment (s_F) (min)	0.14	2.23	66.32 \pm 12.14	95.95 \pm 9.75
			(n=14)	(n=12)
Total duration of xylem sap ingestion (s_G) (min)	0.95	0.003	79.53 \pm 13.48	78.22 \pm 13.82
% of individuals ingesting xylem sap	0.79	0.07	48.28 %	36.36 %

The letters within a row indicate significant differences associated with pairwise comparisons using estimated marginal means. P values are associated with GLM models, using Poisson distribution for the number of feeding phases and Gamma distribution for the mean and total duration of feeding phases, Cox models for the “time to first probe” parameter, and χ test for the % of individuals ingesting phloem and xylem sap (degree of freedom = 1 for each test).

SUPPLEMENTARY TABLE 5 Feeding phases (mean \pm standard error of the mean) of *Cacopsylla pyri* feeding on non-injected trees (named “control”) and on trees after injection of the emulsion solution without essential oil (named “injected control”).

Parameter	p.value	χ^2	Control (n=19)	Injected Control (n=20)
General probing behavior phase				
Total duration of probing (s_Pr) (min)	0.53	0.39	437.62 \pm 12.55	424.80 \pm 16.09
Number of probes (n_Pr)	0.71	0.13	4.16 \pm 0.66	4.40 \pm 0.98
Mean duration of probing events (a_Pr) (min)	0.88	0.02	202.19 \pm 39.85	210.89 \pm 39.26
Time to first probe (t.1Pr) (min)	0.66	0.20	8.93 \pm 1.39	14.07 \pm 4.42
Pathway phase				
Total duration of pathway phase (s_C) (min)	0.71	0.14	208.18 \pm 25.14	194.76 \pm 25.43
Mean duration of pathway phase (a_C) (min)	0.71	0.13	33.23 \pm 7.32	40.28 \pm 18.76
Phloem phase				
Total duration of salivation in phloem vessel (s_E1) (min)	0.66	0.19	125.36 \pm 15.19	113.96 \pm 20.69
			(n=13)	(n=14)
% of individuals ingesting phloem sap	0.99	0.00	72.22 %	70.00 %
Total duration of phloem sap ingestion (s_E2) (min)	0.66	0.20	132.66 \pm 27.35	118.60 \pm 17.90
Other phases				
Total duration of xylem sap ingestion (s_G) (min)	0.07	3.37	42.05 \pm 13.59	80.84 \pm 14.09
% of individuals ingesting xylem sap	0.88	0.02	47.37 %	55.00 %

The letters within a row indicate significant differences associated with pairwise comparisons using estimated marginal means. P values are associated with GLM models, using Poisson distribution for the number of feeding phases and Gamma distribution for the mean and total duration of feeding phases, Cox models for the “time to first probe” parameter, and χ test for the % of individuals ingesting phloem and xylem sap (degree of freedom = 1 for each test).



SUPPLEMENTARY FIGURE 1 Cinnamon EO emulsion particle sizes distribution

References

- 1 FAO, <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> [accessed 9 May 2022].
- 2 Porcel M, Andersson GKS, Pålsson J, and Tasin M, Organic management in apple orchards: Higher impacts on biological control than on pollination, *Journal of Applied Ecology* **55**:2779–2789 (2018).
- 3 Belien T, Raymaekers S, Eraerts M, Mommaerts V, Claus G, Bogen C, *et al.*, Towards Integrated Pest and Pollinator Management in Intensive Pear Cultivation: A Case Study from Belgium, *Insects* **12**:901, Multidisciplinary Digital Publishing Institute (2021).
- 4 DuPont ST, Strohm C, Nottingham L, and Rendon D, Evaluation of an integrated pest management program for central Washington pear orchards, *Biological Control* **152**:104390 (2021).
- 5 Tougeron K, Iltis C, Renoz F, Albittar L, Hance T, Demeter S, *et al.*, Ecology and biology of the parasitoid *Trechmites insidiosus* and its potential for biological control of pear psyllids, *Pest Manag Sci*:ps.6517 (2021).
- 6 Blommers LHM, Helsen HHM, and Vaal FWNM, Life history data of the rosy apple aphid *Dysaphis plantaginea* (Pass.) (Homopt., Aphididae) on plantain and as migrant to apple, *Journal of Pest Science* **77**:155–163 (2004).
- 7 Qubbaj T, Reineke A, and Zebitz CPW, Molecular interactions between rosy apple aphids, *Dysaphis plantaginea*, and resistant and susceptible cultivars of its primary host *Malus domestica*, *Entomologia Experimentalis et Applicata* **115**:145–152 (2005).
- 8 Civolani S, The Past and Present of Pear Protection Against the Pear Psylla, *Cacopsylla pyri* L., ed. by Perveen F, *Insecticides - Pest Engineering*, InTech (2012).

- 9 Civolani S, Leis M, Grandi G, Garzo E, Pasqualini E, Musacchi S, *et al.*, Stylet penetration of *Cacopsylla pyri*; an electrical penetration graph (EPG) study, *Journal of Insect Physiology* **57**:1407–1419 (2011).
- 10 Süle S and Jenser G, Management of pear decline caused by “*Candidatus Phytoplasma pyri*” in Hungary, *Bullerin of insectology* **60**:319–320 (2007).
- 11 Dedryver C-A, Le Ralec A, and Fabre F, The conflicting relationships between aphids and men: A review of aphid damage and control strategies, *Comptes Rendus Biologies* **333**:539–553 (2010).
- 12 Wheeler CE, Vandervoort C, and Wise JC, Organic Control of Pear Psylla in Pear with Trunk Injection, *Insects* **11**:650 (2020).
- 13 VanWoerkom AH, Aćimović SG, Sundin GW, Cregg BM, Mota-Sanchez D, Vandervoort C, *et al.*, Trunk injection: An alternative technique for pesticide delivery in apples, *Crop Protection* **65**:173–185 (2014).
- 14 Fettig CJ, Munson AS, Grosman DM, and Bush PB, Evaluations of emamectin benzoate and propiconazole for protecting individual *Pinus contorta* from mortality attributed to colonization by *Dendroctonus ponderosae* and associated fungi: Bole injection protects *Pinus contorta* from *Dendroctonus ponderosae*, *Pest Manag Sci* **70**:771–778 (2014).
- 15 Wise J, Vanwoerkom A, Aćimović S, Sundin G, Cregg B, and Vandervoort C, Trunk Injection: A Discriminating Delivering System for Horticulture Crop IPM, *Entomology, Ornithology & Herpetology* **3**:126 (2014).
- 16 Berger C and Laurent F, Trunk injection of plant protection products to protect trees from pests and diseases, *Crop Protection* **124**:104831 (2019).
- 17 Docola JJ and Wild PM, Tree Injection as an Alternative Method of Insecticide Application, *Insecticides - Basic and Other Applications*, IntechOpen (2012).
- 18 Fidgeon JG, Kittelson NT, Eckberg T, Docola J, and Randall C, Field Note: Emamectin Benzoate Reduces Defoliation by *Choristoneura occidentalis* Freeman (Lepidoptera: Tortricidae) on Three Host Species, *Western Journal of Applied Forestry* **28**:170–173 (2013).
- 19 Aćimović SG, VanWoerkom AH, Reeb PD, Vandervoort C, Garavaglia T, Cregg BM, *et al.*, Spatial and temporal distribution of trunk-injected imidacloprid in apple tree canopies: Distribution of trunk-injected imidacloprid in apple tree canopy, *Pest Manag Sci* **70**:1751–1760 (2014).
- 20 Byrne FJ, Almanzor J, Tellez I, Eskalen A, Grosman DM, and Morse JG, Evaluation of trunk-injected emamectin benzoate as a potential management strategy for Kuroshio shot hole borer in avocado trees, *Crop Protection* **132**:105136 (2020).
- 21 Khalaf MZ and Alrubeai HF, Chemical control of date palm tree borers, Oryctes species (Coleoptera: scarabidae: Dynastinae), *Pakistan Entomologist*:1–5 (2016).
- 22 Werrie P-Y, Burgeon C, Le Goff GJ, Hance T, and Fauconnier M-L, Biopesticide Trunk Injection Into Apple Trees: A Proof of Concept for the Systemic Movement of Mint and Cinnamon Essential Oils, *Front Plant Sci* **12**:650132 (2021).
- 23 Turek C and Stintzing FC, Stability of Essential Oils: A Review, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **12**:40–53 (2013).

- 24 Harrewijn P, Oosten A, and Piron PGM, Natural Terpenoids as Messengers. A multidisciplinary study of their production, biological functions and practical applications, *Ann Bot* **90** (2001).
- 25 Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, and Idaomar M, Biological effects of essential oils – A review, *Food and Chemical Toxicology* **46**:446–475 (2008).
- 26 Nollet LML and Rathore HS, eds., Green Pesticides Handbook: Essential Oils for Pest Control, 1st ed., CRC Press, Boca Raton : Taylor & Francis, CRC Press, 2017. (2017).
- 27 Reyes-Jurado F, Navarro-Cruz AR, Ochoa-Velasco CE, Palou E, López-Malo A, and Ávila-Sosa R, Essential oils in vapor phase as alternative antimicrobials: A review, *Crit Rev Food Sci Nutr* **60**:1641–1650 (2020).
- 28 Huang Y and Ho SH, Toxicity and antifeedant activities of cinnamaldehyde against the grain storage insects, *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch., *Journal of Stored Products Research* **34**:11–17 (1998).
- 29 Lee E-J, Kim J-R, Choi D-R, and Ahn Y-J, Toxicity of Cassia and Cinnamon Oil Compounds and Cinnamaldehyde-Related Compounds to *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae), *Journal of Economic Entomology* **101**:1960–1966 (2008).
- 30 Kim S-I, Roh J-Y, Kim D-H, Lee H-S, and Ahn Y-J, Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*, *Journal of Stored Products Research* **39**:293–303 (2003).
- 31 Tjallingii WF, Electrical nature of recorded signals during stylet penetration by aphids, *Entomologia Experimentalis et Applicata* **38**:177–186 (1985).
- 32 Denoirjean T, Doury G, Cornille A, Chen X, Hance T, and Ameline A, Genetic structure of *Malus sylvestris* and potential link with preference/performance by the rosy apple aphid pest *Dysaphis plantaginea*, *Sci Rep* **11**:5732 (2021).
- 33 Giordanengo P, EPG-Calc: a PHP-based script to calculate electrical penetration graph (EPG) parameters, *Arthropod-Plant Interactions* **8**:163–169 (2014).
- 34 Tjallingii WF and Esch ThH, Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals, *Physiological Entomology* **18**:317–328 (1993).
- 35 MacGillivray ME and Anderson GB, Three Useful Insect Cages¹, *The Canadian Entomologist* **89**:43–46, Cambridge University Press (1957).
- 36 Crompton DS and Ode PJ, Feeding Behavior Analysis of the Soybean Aphid (Hemiptera: Aphididae) on Resistant Soybean “Dowling,” *Journal of Economic Entomology* **103**:648–653 (2010).
- 37 Dancewicz K, Sznajder K, Załuski D, Kordan B, and Gabryś B, Behavioral sensitivity of *Myzus persicae* to volatile isoprenoids in plant tissues, *Entomologia Experimentalis et Applicata* **160**:229–240 (2016).
- 38 Kordan B, Dancewicz K, Wróblewska A, and Gabryś B, Intraspecific variation in alkaloid profile of four lupine species with implications for the pea aphid probing behaviour, *Phytochemistry Letters* **5**:71–77 (2012).
- 39 Marchetti E, Civolani S, Leis M, Chicca M, Tjallingii WF, Pasqualini E, *et al.*, Tissue location of resistance in apple to the rosy apple aphid established by electrical penetration graphs, *Bulletin of insectology* **62**:203–208.

- 40 Slesak E, Slesak M, and Gabrys B, Effect of Methyl Jasmonate on Hydroxamic Acid Content, Protease Activity, and Bird Cherry–Oat Aphid *Rhopalosiphum padi* (L.) Probing Behavior, *J Chem Ecol* **27**:2529–2543 (2001).
- 41 Powell G, Tosh CR, and Hardie J, Host plant selection by aphids: behavioral, evolutionary, and applied perspectives, *Annu Rev Entomol* **51**:309–330 (2006).
- 42 Perina FJ, de Andrade CCL, Moreira SI, Nery EM, Ogoshi C, and Alves E, *Cinnamomum zeylanicum* oil and trans-cinnamaldehyde against *Alternaria* brown spot in tangerine: direct effects and induced resistance, *Phytoparasitica* **47**:575–589 (2019).
- 43 Bruce TJ, Birkett MA, Blande J, Hooper AM, Martin JL, Khambay B, *et al.*, Response of economically important aphids to components of *Hemizygia petiolata* essential oil, *Pest Management Science* **61**:1115–1121 (2005).
- 44 Abbassy MA, Abdelgaleil SAM, and Rabie RYA, Insecticidal and synergistic effects of *Majorana hortensis* essential oil and some of its major constituents, *Entomologia Experimentalis et Applicata* **131**:225–232 (2009).
- 45 Werrie P-Y, Juillard A, Heintz C, Brisset M-N, and Fauconnier M-L, Phytotoxicity and Plant Defence Induction by *Cinnamomum cassia* Essential Oil Application on *Malus domestica* Tree: A Molecular Approach, *Agronomy* **12**:512, Multidisciplinary Digital Publishing Institute (2022).
- 46 Berrueta LA, Sasía-Arriba A, Miñarro M, Antón MJ, Alonso-Salces RM, Micheletti D, *et al.*, Relationship between hydroxycinnamic acids and the resistance of apple cultivars to rosy apple aphid, *Talanta* **187**:330–336 (2018).
- 47 Dudareva N, Negre F, Nagegowda DA, and Orlova I, Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives, *Critical Reviews in Plant Sciences* **25**:417–440, Taylor & Francis (2006).
- 48 Pompon J, Quiring D, Giordanengo P, and Pelletier Y, Role of xylem consumption on osmoregulation in *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas), *J Insect Physiol* **56**:610–615 (2010).
- 49 Ramírez CC and Niemeyer HM, The Influence of Previous Experience and Starvation on Aphid Feeding Behavior, *Journal of Insect Behavior* **13**:699–709 (2000).
- 50 Spiller N j., Koenders L, and Tjallingii W f., Xylem ingestion by aphids – a strategy for maintaining water balance, *Entomologia Experimentalis et Applicata* **55**:101–104 (1990).
- 51 Dardouri T, Implication des composés organiques volatils dans la capacité des plantes de service à perturber le comportement et les performances de *Myzus persicae* (sulzer) le puceron vert du verger, Université d’Avignon. Phd thesis (2018).
- 52 Ge Y, Liu P, Zhang L, Snyder WE, Smith OM, and Shi W, A sticky situation: honeydew of the pear psylla disrupts feeding by its predator *Orius sauteri*, *Pest Management Science* **76**:75–84 (2020).
- 53 Le Goff GJ, Berthe J, Tougeron K, Dochy B, Lebbe O, Renoz F, *et al.*, Effect of the instar of the pear psyllid *Cacopsylla pyri* (Hemiptera: Psyllidae) on the behaviour and fitness of the parasitoid *Trechnites insidiosus* (Hymenoptera: Encyrtidae), *Eur J Entomol* **118**:279–287 (2021).

Chapitre 4. Perturbation par les biopesticides : exemple des lipopeptides

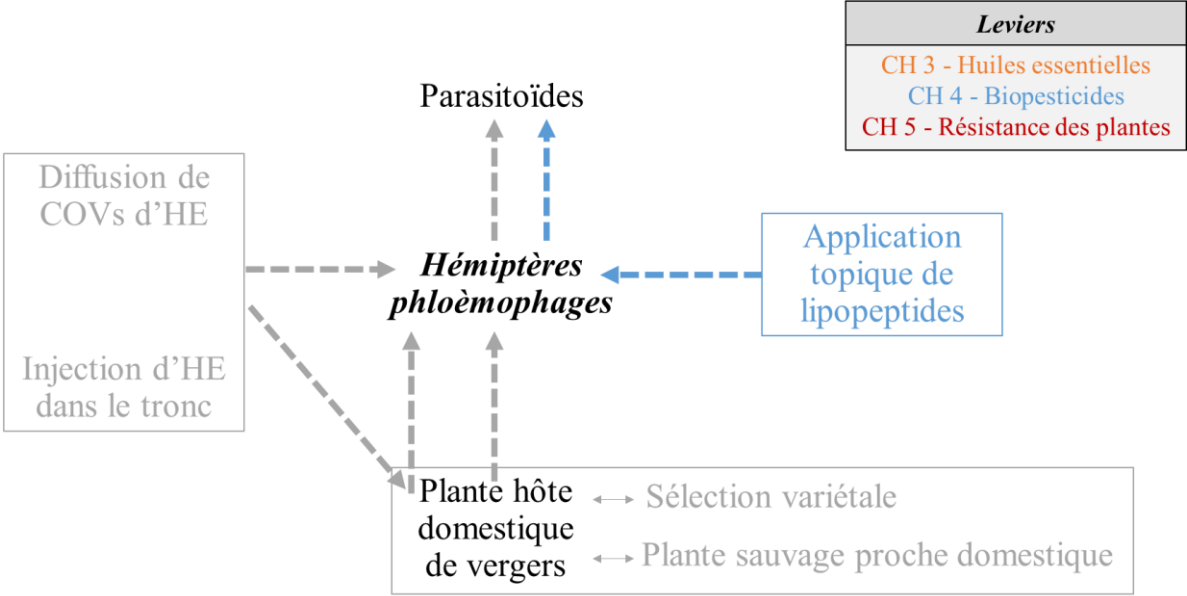


Figure 16 : Leviers basés sur l'utilisation des bio-pesticides

Présentation de l'étude et principaux résultats :

Actuellement, la protection des cultures vis-à-vis des ravageurs passe essentiellement par l'utilisation de pesticides induisant la mort des insectes exposés ; cependant, au-delà des effets létaux les insectes peuvent subir des effets sublétaux des pesticides. Les effets sublétaux ont été définis par Haynes (1988) comme des modifications de la physiologie ou du comportement des individus qui ont survécu à l'exposition à un composé toxique. Ces effets sublétaux peuvent permettre *in fine* une régulation des ravageurs, soit en les affaiblissant, soit en les rendant plus vulnérables pour les niveaux trophiques supérieurs ou les pathogènes. Ainsi la perturbation comportementale et physiologique des individus intoxiqués par une dose sublétale peut être un levier important pour réguler les ravageurs des cultures à conditions d'induire le moins d'impact possible sur la régulation top-down par les ennemis naturels.

Les doses sublétales de pesticides peuvent impacter la localisation de la plante hôte, la réponse aux phéromones sexuelles, ainsi que le comportement alimentaire et d'oviposition chez les insectes. Certains insecticides comme le chlordiméforme, appliqués à des niveaux sublétaux, peuvent entraîner une réduction de l'activité alimentaire des blattes (Beeman & Matsumura, 1978), des insectes piqueurs-suceurs (pucerons, cicadelles et sauterelles) (Hirata & Sogawa, 1976) ou encore de larves de Lépidoptères (Watanabe & Fukami, 1977). Les effets sublétaux des pesticides peuvent aussi se manifester sur les traits d'histoire de vie des ravageurs par une réduction de la fécondité (diminution de la charge en œufs et/ou de durée de la période d'oviposition), une augmentation de la durée de développement des stades immatures ou une diminution de la longévité des adultes (Franca *et al.*, 2017). Les effets sublétaux des pesticides peuvent cependant aussi affecter les ennemis naturels des ravageurs, soit directement quand ceux-ci sont exposés aux pesticides, soit indirectement quand c'est leur proie/hôte qui est exposé (pour une revue, voir Desneux *et al.* (2007)). Les effets sublétaux directs et indirects des pesticides sur la physiologie des parasitoïdes ont été largement décrits, mais bien que les effets sublétaux sur le comportement puissent aussi réduire le potentiel de régulation naturelle des parasitoïdes, l'essentiel des études portent sur les effets directs des pesticides sur le comportement des parasitoïdes. Par exemple, la réponse des parasitoïdes au complexe d'odeurs insectes hôtes-plantes peut être diminuée suite à une exposition aux pesticides (Stapel *et al.*, 2000). Pour ce qui est de la perturbation du comportement d'oviposition, suite à une exposition à des doses sublétales de pesticides, des femelles parasitoïdes ont présenté un retrait non coordonné de leur ovipositeur ce qui les a rendues incapables de pondre dans leur hôte (Alix *et al.*, 2001; Desneux *et al.*, 2004). Aussi, la fréquence des comportements impliqués dans la sélection de l'hôte par les femelles parasitoïdes (examination antennaire de l'hôte, comportement d'oviposition, etc.) est souvent diminuée suite à une exposition aux pesticides (Desneux *et al.*, 2007).

Les bactéries *Bacillus sp.* sont souvent considérées comme des usines microbiennes pour la production d'une vaste gamme de molécules biologiquement actives potentiellement inhibitrices de la croissance des phytopathogènes (Emmert & Handelsman, 1999). Ces micro-

organismes peuvent produire plus de deux douzaines de composés antimicrobiens de structure différente (Stein, 2005). Parmi ces composés antimicrobiens se trouvent les lipopeptides cycliques, regroupés dans trois grandes familles : les Surfactines, les Iturines et les Plipastatines. Elles ont toutes trois des activités antifongiques, avec différents niveaux d'efficacité, et présentent un effet synergique (Deravel *et al.*, 2014). L'activité antimicrobienne semble réservée aux Surfactines (Ongena & Jacques, 2008). Récemment dans la littérature, le potentiel insecticide des Surfactines a été mis en avant (pour un recensement des études sur le sujet, voir Denoirjean *et al.*, 2022a). Ces lipopeptides peuvent être utilisés en vergers de pommiers pour traiter des pathogènes comme celui responsable de la tavelure (*Venturia inaequalis* (Venturiaceae) G. Winter) (Desmyttere *et al.*, 2019) ou celui du feu bactérien (*Erwinia amylovora* (Enterobacteriaceae) Hauben) (Mora *et al.*, 2015).

Les lipopeptides pourraient donc être utilisés pour une protection globale des vergers vis-à-vis des pathogènes et des ravageurs, d'autant plus que les Surfactines sont incluses dans les mélanges antifongiques utilisés pour contrôler la tavelure (Leconte *et al.*, 2022). En effet, bien que leurs activités antifongiques soient plus faibles que celles des autres familles de lipopeptides, quand elles sont associées à d'autres lipopeptides l'activité fongicide du mélange peut être plus forte que celle des différents lipopeptides seuls (Deravel *et al.*, 2014). Cependant, quasiment aucune étude n'a comparé les activités insecticides des trois familles de lipopeptides (à notre connaissance, seuls Assié *et al.* (2002) ont comparé deux des trois familles de lipopeptides) ou étudié l'effet de l'association des lipopeptides sur leur efficacité. De plus, les effets sublétaux des lipopeptides sur les insectes ravageurs comme sur leurs ennemis naturels restent largement inconnus.

Notre problématique est donc la suivante : quels sont les effets létaux des lipopeptides sur les pucerons, et pour les survivants, quels sont les effets sublétaux sur le comportement des pucerons et de leurs parasitoïdes ? Nous émettons les hypothèses suivantes : i) les lipopeptides ont un effet léthal sur les pucerons à certaines concentrations, ii) pour les pucerons survivants les lipopeptides présentent des effets sublétaux sur leur comportement locomoteur et alimentaire, iii) il existe potentiellement un effet cascade de ces effets sublétaux sur le comportement des parasitoïdes.

La première étude visait à évaluer la létalité par contact topique des trois familles de lipopeptides (les Iturines, les Plipastatines et les Surfactines) et leurs effets sublétaux sur le comportement locomoteur et alimentaire des pucerons *D. plantaginea* survivants. Les différentes familles de lipopeptides ont été testées seules ou en mélange ternaire, pour tester l'existence d'un éventuel effet synergique sur leur propriété aphicide. La mortalité des pucerons cendré du pommier *D. plantaginea* exposés par contact topique à trois concentrations de lipopeptides a été mesurée à une heure et vingt-quatre heures post-exposition, puis le comportement locomoteur et alimentaire des survivants suite à l'application d'une concentration donnée ont été étudiés. Des trois familles de lipopeptides, les Surfactines ont présenté la plus grande activité aphicide ; les Plipastatines n'étaient létales qu'à la plus forte

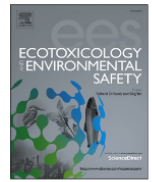
concentration testée, tandis que les Iturines n'ont jamais induit de mortalité. Bien que les lipopeptides montrent un effet synergique quant à leur activité antifongique lorsque les différentes familles sont associées en mélange, dans notre étude nous n'avons pas mis en évidence un effet synergique en lien avec l'activité insecticide des lipopeptides. Concernant les effets sublétaux, les Iturines ont augmenté la vitesse des pucerons, tandis que le mélange de lipopeptides a limité leur capacité de dispersion. Enfin, les pucerons ayant survécu à l'exposition aux Surfactines avaient une durée d'ingestion de sève plus importante.

Les Surfactines constituaient donc, au regard de leur létalité, la famille de lipopeptides la plus prometteuse en tant qu'aphicide. Cependant, il est possible que les effets létaux et sublétaux des Surfactines soient plus faibles sur des pucerons généralistes, dans la mesure où l'on considère que les insectes spécialistes ont probablement une meilleure résistance aux pesticides (Bras *et al.*, 2022). De plus, les effets des Surfactines sur les pucerons peuvent diminuer leur qualité en tant qu'hôte ou proie pour les ennemis naturels, ce qui limiterait de façon non intentionnelle l'efficacité de la régulation naturelle des populations de pucerons ravageurs. Ainsi, dans la seconde étude de ce chapitre, nous avons sélectionné les lipopeptides aux plus fortes propriétés aphicides, les Surfactines, afin de tester leurs effets sur *A. fabae*, un puceron généraliste et ravageur potentiel du pommier. Comme dans la première étude, la mortalité liée à l'exposition aux Surfactines a été évaluée à une heure et vingt-quatre heures post-exposition. En plus des adultes, les expériences ont aussi été conduites sur de jeunes larves, dans la mesure où ces dernières sont les stades de l'hôte dans lesquels les femelles parasitoïdes pondent préférentiellement. Le comportement locomoteur des adultes a été modifié par l'exposition aux Surfactines (vitesse et dispersion plus importantes), tandis que chez les larves le taux d'individus sans activité locomotrice était plus important chez les larves traitées. En ce qui concerne le comportement alimentaire des adultes, la durée totale d'ingestion de sève phloémienne était plus faible tandis que les durées d'ingestion xylémienne et de déraillement des stylets étaient plus longues chez les pucerons exposés aux Surfactines comparés aux témoins, révélant un stress des pucerons exposés. Dans un second temps, nous avons étudié les répercussions de l'exposition du puceron hôte sur le comportement de sélection de l'hôte par les femelles parasitoïdes d'*A. matricariae*, une espèce généraliste faisant partie des régulateurs de pucerons en vergers. Ce comportement n'a pas été impacté par l'exposition des pucerons hôtes aux Surfactines : en effet, aucune différence n'a été observée, que ce soit pour le temps de latence avant le premier contact avec un hôte et le statut (exposé ou non aux Surfactines) de ce premier hôte (le nombre moyen des différents comportements aboutissant à l'insertion de l'ovipositeur), ou encore le taux d'oviposition réelle dans les pucerons hôtes.



Contents lists available at ScienceDirect

Ecotoxicology and Environmental Safety

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecoenv

Effects of *Bacillus* lipopeptides on the survival and behavior of the rosy apple aphid *Dysaphis plantaginea*

Thomas Denoirjean^a, Géraldine Doury^a, Pedro Poli^a, François Coutte^b, Arnaud Ameline^{a,*}

^a UMR CNRS 7058 EDYSAN (Ecologie et Dynamique des Systèmes Anthropisés), SFR Condorcet FR CNRS 3417, Université de Picardie Jules Verne, 33 rue St Leu, F-80039 Amiens Cedex, France

^b Université de Lille, UMRt 1158 BioEcoAgro – INRAE, équipe Métabolites secondaires d'origine microbienne – Institut Charles Viollette, SFR Condorcet FR CNRS 3417, F-59000 Lille, France

* Corresponding author

Abstract

Within the framework of biocontrol development, several natural lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* show well-documented anti-microbial properties, especially in orchards. However, the number of studies on their putative insecticidal effects remain low despite the growing interest to develop new strategies of orchards pests' control. The rosy apple aphid *Dysaphis plantaginea* is the major aphid pest causing great leaf damage to apple trees. In this study, we submitted young adult aphids to topical application of three different families of lipopeptides, Plipastatin (Fengycin), Mycosubtilin (Iturin), and Surfactin, either separately or as a ternary mixture. Their aphicidal effects were investigated at 1, 2.5 and 5 g/L, both at 1 h and 24 h after exposure, and their effects on aphid behavior were studied at the 2.5 g/L concentration at 24 h after exposure. When delivered alone, lipopeptides displayed contrasted effects varying from no aphicidal activity for Mycosubtilin to a mortality induced even at low concentrations by Surfactin. Surprisingly, locomotor activity of the surviving aphids was only affected by the two least lethal treatments, Mycosubtilin and the ternary mix. Their feeding behavior was only impacted by Surfactin, the most lethal treatment, that unexpectedly increased phloem sap ingestion. The results are discussed in the context of lipopeptides applicability for integrated pest management.

Keywords

Bacillus subtilis, Insecticidal activity, Sublethal effects, Insect behavior, Biopesticides, Electropenetration

1. Introduction

The heavy use of chemical pesticides to achieve crop protection raises growing concerns about their possible adverse effects on biodiversity, environment pollution as well as human health (Lechenet *et al.*, 2017). Bio-pesticides, which are living organisms or products derived from them (Thakur *et al.*, 2020), are considered as promising alternative products in this context. *Bacillus subtilis* is a commonly used bacterial bio-pesticide agent (Stein, 2005), its biocidal activities being considered to mainly rely on cyclic lipopeptides. Due to their low ecotoxicity compared to their chemical counterparts (Deravel *et al.*, 2014) and their high biodegradability (Mulligan, 2005), lipopeptides represent sustainable promising biocontrol products.

Bacillus lipopeptides are formed of a cyclic peptide linked to a fatty acid chain and are divided into three families: Fengycin (Fengycin, Plipastatin), Iturin (Iturin A, Mycosubtilin and Bacillomycin) and Surfactin (Surfactin, Pumilacidin) (Maksimov *et al.*, 2020). Lipopeptides of a given class may differ in terms of the number of carbon atoms fatty acid chain, and the amino acid composition of the cyclic peptide can also be subject to minor modification, determining various isoforms (de Souza *et al.*, 2018). Both Fengycin and Surfactin interact with lipid layers, altering the cell membrane in a dose-dependent way, and could induce cell lysis at high concentrations (Ongena and Jacques, 2008). Iturin has antifungal properties based on osmotic perturbation due to the formation of ion-conducting pores (Aranda *et al.*, 2005), and preferentially interact with sterols of biological membranes (Nasir and Besson, 2012).

These different modes of action at the molecular level engender contrasted biocide activities. Iturin displays the strongest antifungal activity, contrary to Surfactin which shows limited antifungal properties. Regarding lipopeptides herbicidal activity, only one study revealed an effect of Surfactin against *Poa annua* (Guo *et al.*, 2015). Of all lipopeptides, Surfactin displays the strongest insecticidal activity that can affect different orders such as Hemiptera (Yun *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2017), Lepidoptera (Guo *et al.*, 2015), and Diptera (Assié *et al.*, 2002; Geetha *et al.*, 2012).

All these biocide activities could be exploited to develop new strategies to protect apple orchards, as the cultivated apple *Malus domestica* is one of the most treated fruit crops (Drogué and DeMaria, 2012). In Europe, apple orchards are targeted by many pests and diseases. The main threat of apple orchards are pathogens, mainly fungi, such as powdery mildew *Podosphaera leucotricha* and apple scab *Venturia inaequalis*, the latter being the most

damaging. Fire blight is caused by a bacterium, *Erwinia amylovora*. Lipopeptides have already been shown to be efficient against apple scab (Desmyttere *et al.*, 2019). Moreover, *Bacillus* strains producing lipopeptides have shown an ability to fight against fire blight (Mora *et al.*, 2015). However, their broad activity spectrum makes them ideal to try and control both orchard pathogens and pests.

Numerous insect pests also target apple trees. Some induce fruit damage, such as the apple codling moth *Cydia pomonella* or the brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys*. Others impair fruit production by damaging the flowers, such as the apple sawfly *Hoplocampa testudinea*, or by ingesting phloem sap such as the aphids *Aphis pomi* and *Dysaphis plantaginea*. Finally, the wooly aphid *Eriosoma lanigerum* damages the trunk of apple trees. However, so far, the effects of lipopeptides remain unknown on apple pests.

The purpose of the current work was to evaluate the aphicidal activity of lipopeptides on the rosy apple aphid (RAA) *D. plantaginea*, the major aphid pest of the cultivated apple *M. domestica* in Europe, Maghreb, and North America (Qubbaj *et al.*, 2005). This aphid species develops at the apex of branches and/or on the most recently developed leaves, where it feeds on sap drawn from the phloem. RAA saliva secretion in phloem causes leaf-rolling and impairs shoots growth, provoking great yield loss. For the present work, the effects of different lipopeptides were tested at three different concentrations and compared on *D. plantaginea*: Plipastatin (Fengycin), Mycosubtilin (Iturin) and Surfactin (Surfactin), separately or in a ternary mixture as they may display synergic effects (Deravel *et al.*, 2014). Among the three main routes of exposure (inhalation, ingestion, contact), topical contact was selected for our bioassays as the most plausible in a context of field spraying. The efficiency of a bio-pesticide should also take into account its sublethal effects (Franca *et al.*, 2017), defined as modifications of the behavior or fitness of individuals who survived exposure to a toxic compound (Haynes, 1988). The sublethal effects of lipopeptides were investigated at a defined concentration on *D. plantaginea* locomotor behavior using a target arena, and feeding behavior via the electropenetrography (EPG) technique.

2. Materials and methods

2.1. Insects and plants

A single colony of *D. plantaginea* (Hemiptera: Aphididae) was used. Aphids were sampled as a population in spring 2018 from an apple tree at the Agrocampus Ouest orchard that had never been treated by pesticides, and kindly provided by INRAE (Angers, France) (Philippe Robert, personal communication). The aphid population was mass reared without differentiating individual aphid clones on *M. domestica* cv. “Jonagold” plants obtained by *in vitro* multiplication (Druart, 1997). Pots containing three host plants (90 × 90 × 70 mm) were placed

in a Plexiglas cube (50 cm). Mass rearing and all the experiments were performed in growth chambers under 20 ± 1 °C, $60 \pm 5\%$ RH, and a 16:8 L:D cycle.

Synchronized first instar nymphs were obtained by placing parthenogenetic adult females on plants for 24 h, after which all the females were removed. The larvipaused nymphs were reared on the plants inside Plexiglas aerated boxes ($36 \times 24 \times 14$ cm) for ten days, then used as young RAA adults for the experiments.

2.2. Lipopeptides production and purification

Lipopeptides were produced in shacked flasks by different strains of *B. subtilis* using modified Landy media according to Coutte *et al.* (2010a) for Plipastatin and Surfactin, and according to Béchet *et al.* (2013) for Mycosubtilin. Briefly, Surfactin was produced by the *B. subtilis* BBG131 strain (Coutte *et al.*, 2010a), Plipastatin by the *B. subtilis* BS2504 strain (Ongena *et al.*, 2007) and Mycosubtilin by the *B. subtilis* BBG125 strain (Béchet *et al.*, 2013). After the production step, the lipopeptides were purified and extracted using ultrafiltration process with four steps of sequential diafiltration according to Coutte *et al.* (2010b). At the end of the process, lipopeptides were freeze dried. Purity of the lipopeptides powders were evaluated using UPLC method as described just below. Isoforms composition of the different lipopeptides produced were already analyzed by mass spectrometry and published (Mejri *et al.*, 2017). Surfactin isoforms are composed with different fatty acid chain length from C12 to C16 carbons, Mycosubtilin with fatty acid chain of C15 to C18 and Plipastatin with saturated and unsaturated fatty acid chain of C14 to C18.

Lipopeptides solutions were prepared by solubilizing powder at 20 °C in a 5% dimethylsulfoxide (DMSO) and 0.2% Heliosol (ActionPin, France) stirred solution at the concentrations of 1, 2.5 and 5 g/L. The concentrations were chosen according to Yun *et al.* (2013). The control solution was made from ultrapure water also in 5% DMSO and 0.2% Heliosol stirred solution. Addition of Heliosol is justified by the fact that it is an adjuvant very often used for the treatment of different crops and especially for apple trees. The lipopeptides powders and the lipopeptides solutions (in 5% DMSO and 0.2% Heliosol) were analyzed by reverse phase high-performance liquid chromatography using a C18 column on Acquity UPLC system (Waters, Milford, MA, USA) according to Guez *et al.* (2021) for Surfactin and Mycosubtilin. The same equipment was used for Plipastatin powder and solutions analysis, except that the elution was performed using a gradient of acetonitrile/water/trifluoroacetic acid from 45/55/0.1 to 55/45/0.1 (v/v/v) for 30 min. Purified lipopeptides (Surfactin, Fengycin and Iturin A) supplied by Sigma Aldrich (Saint Louis, USA) were used as standards.

The three lipopeptides (Plipastatin, Mycosubtilin, Surfactin) were tested alone (P, M, S, respectively) and in a ternary mixture (PMS, 33% v/v/v of each lipopeptide solution).

2.3. Aphid exposure to lipopeptides

Aphicidal effects are classically evaluated at 24 h after topical exposure (Yun *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2017), but can also be immediate (Najar-Rodriguez *et al.*, 2007). Therefore, the aphicidal activity of lipopeptides topically applied on aphids was evaluated at two different time scales, 1 h and 24 h. Using an Eppendorf micropipette (0.1–2.5 μ l), 0.2 μ l of lipopeptides solution or control solution was applied topically onto the abdomen of each young aphid adult. After topical application, that was performed in the middle of photophase, aphids were left for one hour in the Petri dish in which they had been treated, in order to allow for the solution to penetrate their cuticle. They were then transferred on an artificial diet (Febvay *et al.*, 1988; Down *et al.*, 1996) for 24 h before being used for the behavioral and physiological bioassays. All the experiments were conducted at 20 ± 1 °C, $60 \pm 5\%$ relative humidity.

2.4. Aphid survival and mortality

One purpose of this experiment was to evaluate the effect of lipopeptides on aphids mortality at two different time scales. For each lipopeptide and the ternary mix, three different concentrations were tested (1, 2.5 and 5 g/L) and applied onto aphids by topical contact as described above. One hour after topical application (i.e. before transferring aphids onto an artificial diet), the mortality at 1 h (here defined as the mortality occurring within one hour following the exposure) was first assessed as the number of dead aphids recorded at 1 h after exposure. At twenty-four hours after topical application, the mortality was calculated as the total number of aphids recorded dead both at 1 h and 24 h after exposure. Based on the results for aphicidal activities, the concentration of 2.5 g/L was selected to study the sublethal effect of aphids exposure to lipopeptides on their locomotor and feeding behavior.

2.5. Aphid locomotor activity

To study the sublethal effect of exposure to lipopeptides (2.5 g/L) on the locomotor behavior of *D. plantaginea* young adults, dispersion behavior and speed of aphids exposed to the control or lipopeptides solutions were monitored on a target arena according to the methodology of Chesnais *et al.* (2020) (Fig. 1). Each aphid was individually deposited in the center of the test arena (285 mm diameter) consisting of 10 concentric circles (“spatial zones”) spaced 15 mm apart and covered by a transparent glass plate that was cleaned every five recordings with ethanol then water. The arena was placed between four white foam cardboard “walls” (45 cm high) to avoid external stimuli. For each aphid, the time taken (in sec.) to cross a given spatial zone for a maximum of 300 s (“speed” parameter), the time taken (in sec.) to exit the arena (“dispersion” parameter) and the total number of spatial zones crossed were determined. The test was completed (i) if the aphid crossed the 10th spatial zone and left the arena, or (ii) at the

end of the 300 s. Results were analyzed for the responding adults ($n_C = 37$; $n_P = 32$; $n_M = 33$; $n_S = 27$; $n_{PMS} = 38$).

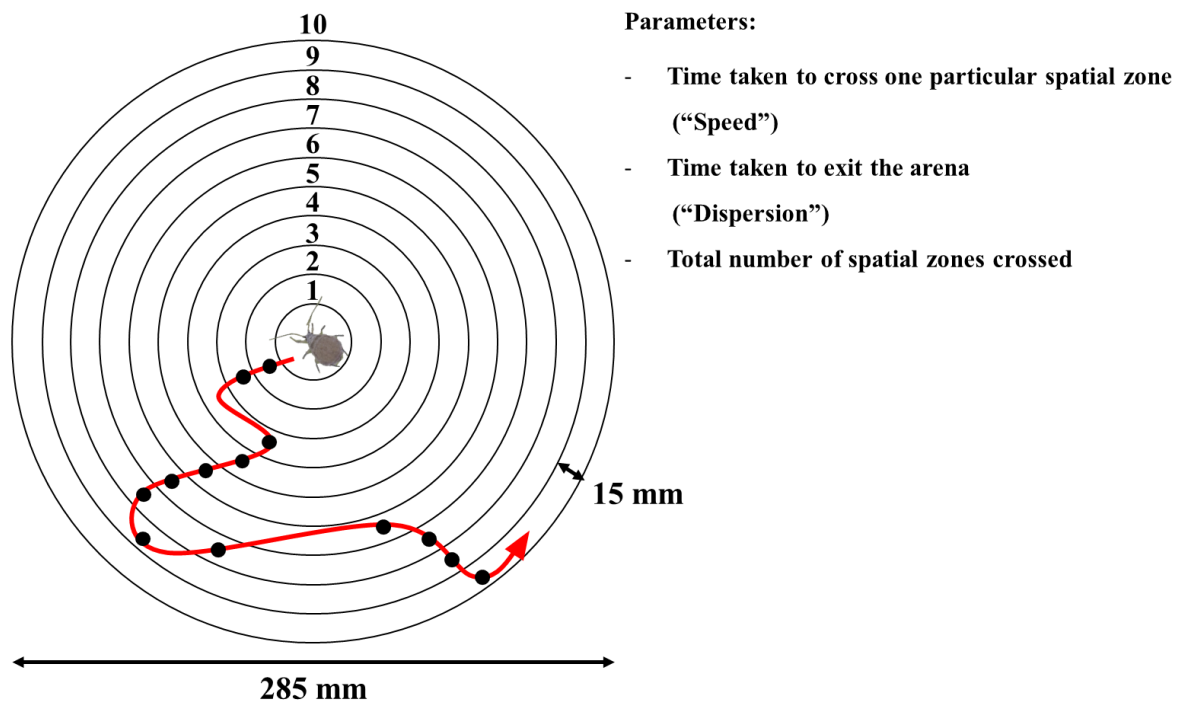


FIGURE 1 Bioassay set-up used, to record dispersion behavior and locomotor activity of aphids in a paper arena covered with a squared glass plate. Red line: example of an aphid path observed on the arena in 300 s; black dots: number of spatial zones in which the aphid had entered. The “speed” parameter was defined as the average duration of the time (in sec.) taken to cross one particular spatial zone. The time taken to exit the arena (in sec.) was considered as a “dispersion” parameter. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.) adapted from Chesnais *et al.* (2020).

2.6. Aphid feeding behavior

The aim of this experiment was to study the sublethal effect of aphid adults exposure to lipopeptides (2.5 g/L) on their feeding behavior. Electrical penetration graphs (EPG) (Tjallingii, 1985) were obtained by connecting individual aphids placed on the abaxial side of a leaf of an individual plant inside a Faraday cage to the Giga-8 DC-EPG amplifier. The recordings were carried out continuously for eight hours during the photophase. Acquisition and analysis of the EPG waveforms were performed using the EPG Stylet+ daq software (EPG Systems, www.epgsystems.eu). Parameters from the recorded waveforms were calculated using the EPG-Calc 6.1.7 software (Giordanengo, 2014). They were based on different EPG waveforms (Tjallingii and Esch, 1993) corresponding to total stylet probing activity within plant tissues, sustained phloem sap ingestion (duration > 10 min) and xylem sap ingestion. A total of 32

plants were used for the EPG records that were obtained for the following numbers of aphids: $nC = 28$; $nP = 20$; $nM = 22$; $nS = 26$; $nPMS = 28$.

2.7. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using the R software version 3.6.2 (The R Foundation, <https://www.r-project.org/>). For all the parameters studied, results obtained for each treatment were compared with the ones obtained for the control. A Firth's penalized logistic regression with the package *logistf* (Heinze *et al.*, 2020) was used to evaluate the effect of topical exposure to lipopeptides on aphid mortality. The impact of lipopeptides on aphid locomotor and feeding behaviors was assessed carrying out a permutation test (5000 replicates) to test for the significance of the differences of the means of each parameter between controls and treated aphids.

3. Results

3.1. Mortality

Overall, most aphids remained alive following exposure to lipopeptides at 1 and 2.5 g/L except for those exposed to Surfactin (Fig. 2). Regarding the immediate mortality, Surfactin at 1 and 2.5 g/L concentrations induced significant aphid mortalities at 1 h compared to the control (Firth's penalized logistic regression, $p = 0.004$ and $p < 0.001$, respectively) of *ca.* 25% and *ca.* 40%, respectively. At the 5 g/L concentration, compared to the control, Plipastatin, Surfactin and the PMS ternary mix induced a significant aphid mortality (Firth's penalized logistic regression, $p < 0.001$, $p < 0.001$ and $P = 0.013$, respectively). Plipastatin and Surfactin induced *ca.* 80% of aphid mortality, and *ca.* 40% of the aphid exposed to the PMS ternary mix were dead at 1 h. Exposure to lipopeptides resulted in mortalities at 24 h that were similar to those measured at 1 h, suggesting that most of aphid mortality had occurred within the first hour following topical exposure. Because most treatments induced mortalities above 50% or more at the 5 g/L concentration, this concentration was excluded to test for sublethal effects on surviving aphids. Except for Surfactin (S) that was globally lethal whatever the concentration, for all the other treatments (P, M, PMS) both the 1 g/L and 2.5 g/L concentrations induced mortalities in adults that were not significantly different compared to controls and could therefore be considered sublethal as defined by Desneux *et al.* (2007). To carry out all behavioral bioassays, we selected the greatest concentration among those two, that is 2.5 g/L.

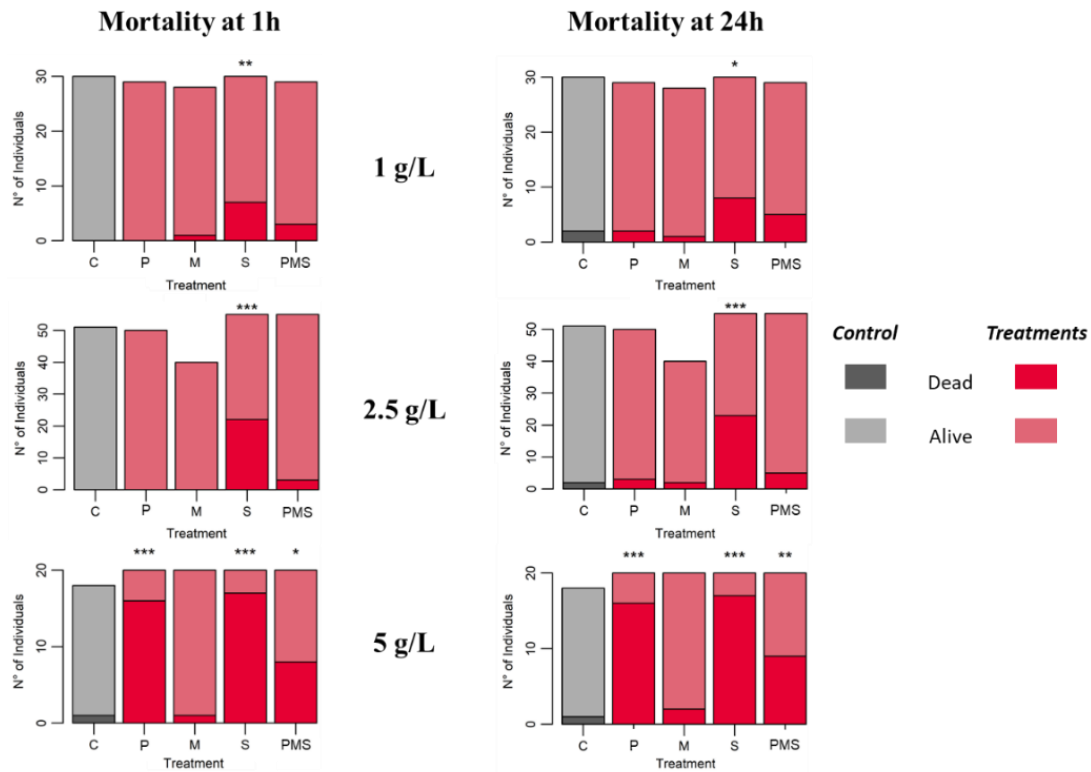


FIGURE 2 Number of dead and alive *D. plantaginea* adults at two different time scales following topical exposure (1 h and 24 h) to lipopeptides at three different concentrations (1, 2.5 and 5 g/L). C: Control; P: Plipastatin; M: Mycosubtilin. S: Surfactin; PMS: Ternary mixture of Plipastatin, Mycosubtilin and Surfactin. Mortality induced by each treatment was compared with the control using the Firth's penalized logistic regression (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

3.2. Locomotor behavior

Compared to controls, aphids exposed to Mycosubtilin took significantly less time to cross a given spatial zone (permutation test, $p = 0.046$), indicating that their speed was greater (Table 1). Also, they took significantly less time to exit the arena (permutation test, $p = 0.048$), highlighting a greater dispersion compared to controls following Mycosubtilin exposure. On the contrary, aphids exposed to the PMS ternary mix took significantly more time to exit the arena compared to controls (permutation test, $p = 0.004$), suggesting that the PMS ternary mix did reduce aphid dispersion. Finally, the total number of spatial zones crossed by aphids exposed to the PMS ternary mix was significantly greater compared to controls (permutation test, $p = 0.022$). Plipastatin and Surfactin had no significant effect on aphid locomotion.

TABLE 1 Sublethal effects of lipopeptides (2.5 g/L concentration) on the locomotor behavior of exposed *D. plantaginea* adults.

	Control	Plipastatin	Mycosubtilin	Surfactin	PMS ternary mix
<i>Number of aphids</i>	<i>37</i>	<i>32</i>	<i>33</i>	<i>27</i>	<i>38</i>
Speed (Time in sec. to cross one spatial zone)	10.34 ± 0.84	9.58 ± 0.64	8.33 ± 0.47 (*)	10.06 ± 0.96	11.58 ± 0.82
Dispersion (Time in sec. to exit the arena)	111.00 ± 9.76	106.29 ± 7.47	96.90 ± 7.13 (*)	116.89 ± 11.44	123.21 ± 10.44 (*)
Total number of spatial zones crossed	10.78 ± 0.34	10.59 ± 0.47	10.48 ± 0.35	10.74 ± 0.59	13.07 ± 0.69 (***)

Means ± sem; Locomotor items were compared two by two with the control using a permutation test (*: p < 0.05; ***: p < 0.001). Italic: number of individuals; bold: significant differences between a given treatment and control.

3.3. Feeding behavior

Compared to the controls, the total duration of probing was not significantly different for each lipopeptide treatment and lasted on average around 380 min (Fig. 3a). The total duration of sustained phloem sap ingestion was significantly greater for aphids exposed to Surfactin (160.69 ± 7.24 mins) compared to controls (103.92 ± 4.06 mins) (permutation test, $p = 0.040$) (Fig. 3b). Finally, although no significant difference could be observed, aphids exposed to Plipastatin, Mycosubtilin and the ternary mixture tended to ingest xylem sap for a greater total duration compared to controls (Fig. 3c).

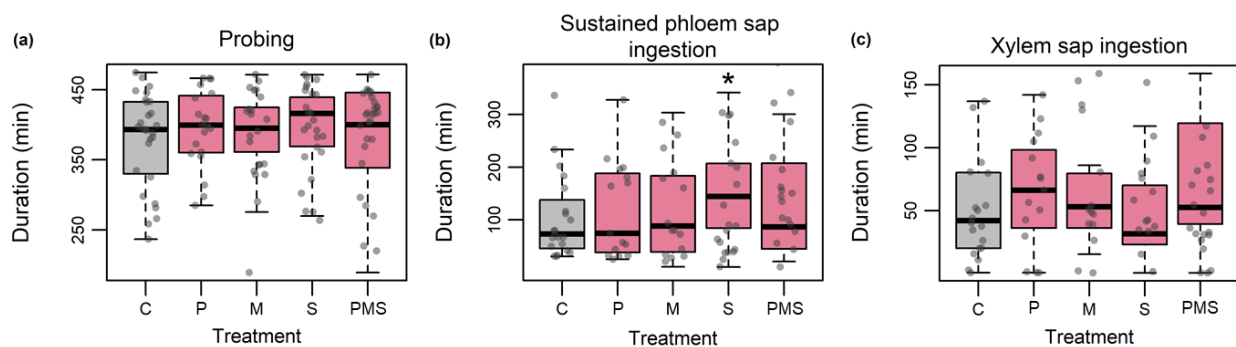


FIGURE 3 Feeding behavior parameters of *D. plantaginea* adults topically exposed to the control or the 2.5 g/L lipopeptides solutions. (a) Total duration of probing phase in plant tissue; (b) Total duration of sustained phloem sap ingestion (> 10 min); (c) Total duration of xylem sap ingestion. C: Control; P: Plipastatin; M: Mycosubtilin. S: Surfactin; PMS: Ternary mixture of Plipastatin, Mycosubtilin and Surfactin. The asterisks indicate a significant difference between aphids exposed to control and the corresponding lipopeptides solution (Monte-Carlo permutation test on differences in means, *: $p < 0.05$).

4. Discussion

Our study confirmed that Surfactin is the best insecticidal candidate compared to other lipopeptide families, as they induced mortality in aphids even at the lowest concentration tested. Surfactin is the lipopeptide in which insecticidal effects have been the most researched. It is lethal to Diptera and Lepidoptera by ingestion (Assié *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2015), and to Diptera and Hemiptera by topical contact (Geetha *et al.*, 2012; Yun *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2017). Our study also revealed that at the highest concentration tested (5 g/L) Plipastatin induced *ca.* 70% mortality in the topically exposed aphids. The insecticidal effect of Fengycin was previously described on a Lepidopteran pest, via ingestion (Kim *et al.*, 2004). The lack of aphicidal activity we recorded here for Mycosubtilin seems congruent with the study by Assié *et al.* (2002) showing that Iturin incorporated to an artificial diet did not induce mortality for

Drosophila melanogaster (Diptera). Topical aphicidal properties of lipopeptides could be explained by their capacity to interfere with lipid layers (Ongena and Jacques, 2008) and particularly with cuticle molecules such as phospholipids and fatty acids (Puterka *et al.*, 2003; Jang *et al.*, 2013). This interaction between lipopeptides and cuticle molecules can induce aphid cuticle dehydration, as shown in *Rhopalosiphum padi* after a topical exposure to *B. atropheus* surfactants containing the three families of lipopeptides and mainly Surfactin ($\geq 90\%$) (Rodríguez *et al.*, 2018).

Studies investigating the aphicidal effects of lipopeptides vary in terms of aphid lifestage used, dose applied on aphids, aphid species model or mode of exposition (Yun *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2017; Rodríguez *et al.*, 2018; López-Isasmendi *et al.*, 2019). For a same dose, Surfactin-induced mortality is greater in the literature than in our study. At the two highest concentrations used here (2.5 g/L and 5 g/L), we applied 0.5 and 1 μg of lipopeptides per aphid, respectively. For Yun *et al.* (2013), the 0.5 and 1 μg doses induced *ca.* 95% and 99% of mortality in aphids, respectively, compared to *ca.* 40% and *ca.* 85% in our study. This difference in mortalities could be due to the isomers present in the Surfactin extract used in our study. Indeed, Surfactin displays various isomers that differ in their aphicidal activity, as the LC50 or LC90 can be up to three times higher from one isomer to another (Yang *et al.*, 2017). The difference in mortalities could also be attributable to the aphid species used. Adults weigh *ca.* 560 μg in *D. plantaginea* (Denoirjean *et al.*, 2021) versus *ca.* 270 μg in *Myzus persicae* (Baudry *et al.*, 2021). In their study Yun *et al.* (2013) used *M. persicae* second instar nymphs that are even lighter compared to adults, which could contribute to the greater mortality observed in this other aphid species compared to our study.

Finally, we showed that when applied in a ternary mixture, lipopeptides did not display synergistic effects through greater insecticidal activity, contrary to what has been reported for their antifungal activity. Indeed two by two synergy between lipopeptides has been described for numerous fungal pathogens, mostly between Surfactin and Iturin/Mycosubtilin (Deravel *et al.*, 2014), but also between Surfactin and Fengycin/Plipastatin (Desmyttere *et al.*, 2019).

Our study clearly revealed that lipopeptides treatments induced sublethal effects in surviving aphids by altering adult aphid behavior at the 2.5 g/L concentration used. Concerning the locomotor behavior, aphids exposed to Mycosubtilin exhibited greater speed and dispersion, whereas aphids treated by the PMS ternary mixture had their dispersion reduced compared to controls. Such behavioral impacts have already been credited to the neurotoxic effects of pesticides or surfactants (Drewes *et al.*, 1987; Bayley and Baatrup, 1996) and some lipopeptides (LePage *et al.*, 2005; Velkov *et al.*, 2018), whereas other lipopeptides have been reported to exhibit protective effects on animal nervous systems (Park *et al.*, 2013). In field conditions, a modification of adult aphids locomotion behavior could impact their potential to colonize new host plants and propagate viruses, and also modulate their probability to encounter natural enemies (Irwin *et al.*, 2007).

Concerning aphid feeding behavior, the duration of total stylet probing activity within plant tissues was not affected by lipopeptides exposure, whatever the treatment. Only Surfactin had a significant impact on aphid feeding behavior. Unexpectedly, at the concentration inducing ca. 50% of mortality in Surfactin-treated aphids, phloem sap ingestion revealed to be greater for treated aphids compared to controls. An increased food intake following exposure to pesticides or toxic compounds has been similarly described for rotifers (Liu *et al.*, 2017), daphnies (Liu *et al.*, 2018, 2019; Li *et al.*, 2020) and tadpoles (Semlitsch *et al.*, 1995). This phenomenon could be explained by a mechanism of temporary overcompensation for inhibitory challenges, in which excess in physiological processes provides compensation after damaging stress (Calabrese, 2001; Xie *et al.*, 2012). After a potential cuticle dehydration suggested to occur by Rodríguez *et al.* (2018) as a consequence of lipopeptides treatment, we expected that xylem sap ingestion should be greater for treated aphids to overcome hydric stress. Despite a tendency to ingest xylem sap for a longer time, especially for aphids treated by Plipastatin, no significant difference was observed on treated aphids compared to controls, which invalidates our hypothesis.

On an agronomical point of view, this study confirms the potential of lipopeptides to control aphid populations in the field regarding the insecticidal effects displayed by Surfactin, but also in view of the sublethal behavioral changes recorded in lipopeptides-exposed *D. plantaginea* aphids. As natural substances of microbial origin, lipopeptides represent promising biocontrol agents, especially to regulate pathogens in orchards, where lipopeptides mixtures have been shown as efficient as a conventional fungicide to control apple scab (Desmyttere *et al.*, 2019). Conventional fungicides may have non-intentional effects that are beneficial regarding crop protection, as they can negatively impact numerous crop insects pests (Chalfant *et al.*, 1977; Ledieu and Helyer, 1983; Arakawa *et al.*, 2008). Because lipopeptides appear like broad-spectrum pesticides, our study suggests they could control the rosy apple aphid *D. plantaginea*, by inducing mortality through the use of Surfactin, and/or by affecting its behavior through the same lipopeptides treatments that would be used to protect apple trees against fungi pathogens. Thanks to their wide insecticidal activity spectrum, Surfactins are known to control a myriad of insect taxa. We confirmed here that Surfactins would be the best aphicidal candidates among lipopeptides. Known for their aphicidal effects against the highly polyphagous aphid *M. persicae* (Yun *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2017), they may also be responsible of the aphicidal activity of Bacillus biosurfactants against the cereal specialist *R. padi* (Rodríguez *et al.*, 2018). Our work reveals the applicability of this lipopeptide family to also regulate an orchard specialist aphid pest, the rosy apple aphid. In a context of orchard integrated pest management, it would be interesting to further investigate the insecticidal effects of Surfactin on other apple tree pests such as *C. pomonella* (Lepidoptera), *H. testudinea* (Hymenoptera) and *C. capitata* (Diptera). However, non-intentional effects should also be evaluated as it has been shown that fungicides could negatively affect organisms delivering ecological services such as natural enemies (Sotherton *et al.*, 1987; Sutherland *et al.*, 2010; Delpuech and Allemand, 2011) or pollinators (Johnson *et al.*, 2010; Belsky and Joshi, 2020).

5. Conclusion

The present work is the first study investigating the lethal effects of the three main *Bacillus* lipopeptide families by testing them individually or in a mixture on an insect, here the rosy apple aphid *D. plantaginea*. Their effects on this orchard pest were contrasted, varying from no aphicidal activity for Mycosubtilin whatever the concentration tested, to an aphicidal activity even at low concentration for Surfactin. Mortality occurred immediately, mainly within the first hour after topical exposure. This study also explores for the first time the sublethal effects of exposure to lipopeptides on insect behavior. Again, the effects recorded largely depended on the lipopeptides tested. Surprisingly, the locomotor activity of the surviving aphids was only affected by the least lethal treatments, i.e. Mycosubtilin and the lipopeptides ternary mix. Concerning the feeding behavior, only the most lethal treatment, i.e. Surfactin, had an impact by unexpectedly increasing phloem sap ingestion by aphids.

CRediT authorship contribution statement

Thomas Denoirjean: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft; **Géraldine Doury**: Conceptualization, Methodology, Writing – original draft, Supervision; **Pedro Poli**: Formal analysis, Writing – original draft; **François Coutte**: Conceptualization, Investigation, Resources, Writing – original draft, Funding acquisition; **Arnaud Ameline**: Conceptualization, Methodology, Writing – original draft, Funding acquisition, Supervision.

Declaration of Competing Interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: François Coutte from the University of Lille is also the co-funder of Lipofabrik company which markets mycosubtilin and other lipopeptides from *B. subtilis*.

Acknowledgments

This work was supported by the project PROVERBIO (Protection of orchards by biological control: an adapted selection of auxiliaries) financed by the European Union, under the scope of the FEDER program and INTERREG initiative: Programme 2014 - 2020 INTERREG V-A Belgium - France (France - Wallonie - Vlaanderen). This work was also supported by the funding from the AgriBioPOM research program and from the ALIBIOTECH program funding administered by the Hauts-de-France Region. We thank Philippe Robert (INRAE Agrocampus

Ouest, Angers, France) for providing the population of *Dysaphis plantaginea*. Françoise Dubois is thanked for her technical assistance. We thank Marie-Pierre Boley for her help with the administrative tasks. Michel Yvon is thanked for the locomotor behavior set-up, and Andrew Roots for the critical reading of the English.

References

- Arakawa, T., Yukuhiro, F., Noda, H., 2008. Insecticidal effect of a fungicide containing polyoxin B on the larvae of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), *Mamestra brassicae*, *Mythimna separata*, and *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Entomol. Zool.* 43, 173–181. <https://doi.org/10.1303/aez.2008.173>.
- Aranda, F.J., Teruel, J.A., Ortiz, A., 2005. Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochim Biophys. Acta BBA Biomembr.* 1713, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.05.003>.
- Assié, L.K., Deleu, M., Arnaud, L., Paquot, M., Thonart, P., Gaspar, Ch, Haubruge, E., 2002. Insecticide activity of surfactins and iturins from a biopesticide *Bacillus subtilis* Cohn (S499 strain). *Meded. Rijksuniv. Gent Fak. Van. Landbouw Toegep. Biol. Wet.* 67, 647–655.
- Baudry, X., Doury, G., Couty, A., Fourdrain, Y., van Havermaet, R., Lateur, M., Ameline, A., 2021. Antagonist effects of the leek *Allium porrum* as a companion plant on aphid host plant colonization. *Sci. Rep.* 11, 4032. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83580-8>.
- Bayley, M., Baatrup, E., 1996. Pesticide uptake and locomotor behaviour in the woodlouse: an experimental study employing video tracking and ¹⁴C-labelling. *Ecotoxicology* 5, 35–45.
- Béchet, M., Cast´era-Guy, J., Guez, J.-S., Chihib, N.E., Coucheney, F., Coutte, F., Fickers, P., Lecl`ere, V., Wathelet, B., Jacques, P., 2013. Production of a novel mixture of mycosubtilins by mutants of *Bacillus subtilis*. *Bioresour. Technol.* 145, 264–270. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.123>.
- Belsky, J., Joshi, N.K., 2020. Effects of fungicide and herbicide chemical exposure on apis and non-apis bees in agricultural landscape. *Front. Environ. Sci.* 8, 81. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.00081>.
- Calabrese, E.J., 2001. Overcompensation stimulation: a mechanism for hormetic effects. *Crit. Rev. Toxicol.* 31 (4–5), 425–470. <https://doi.org/10.1080/20014091111749>.
- Chalfant, R.B., Todd, J.W., Kent Taylor, W., Mullinix, B., 1977. Laboratory studies on the antifeeding effect of a fungicide, guazatine, on eleven species of phytophagous insects. *J. Econ. Entomol.* 70, 513–517. <https://doi.org/10.1093/jee/70.4.513>.
- Chesnais, Q., Caballero Vidal, G., Coquelle, R., Yvon, M., Mauck, K., Brault, V., Ameline, A., 2020. Post-acquisition effects of viruses on vector behavior are important components of manipulation strategies. *Oecologia* 194, 429–440. <https://doi.org/10.1007/s00442-020-04763-0>.
- Coutte, F., Lecl`ere, V., B´echet, M., Guez, J.S., Lecouturier, D., Chollet-Imbert, M., Dhulster, P., Jacques, P., 2010a. Effect of pps disruption and constitutive expression of *srfA* on surfactin productivity, spreading and antagonistic properties of *Bacillus subtilis* 168 derivatives. *J. Appl. Microbiol.* 109, 480–491. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04683.x>.


- Coutte, F., Lecouturier, D., Ait Yahia, S., Leclère, V., B'échet, M., Jacques, P., Dhulster, P., 2010b. Production of surfactin and fengycin by *Bacillus subtilis* in a bubbleless membrane bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 499–507. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2504-8>.
- de Souza, C.G., Martins, F.I.C.C., Zocolo, G.J., Figueiredo, J., Canuto, K.M., de Brito, E.S., 2018. Simultaneous quantification of lipopeptide isoforms by UPLC-MS in the fermentation broth from *Bacillus subtilis* CNPMS22. *Anal. Bioanal. Chem.* 410, 6827–6836. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1281-6>.
- Delpuech, J.-M., Allemand, R., 2011. Side effects of fungicides on the abundance and the species diversity of the natural populations of *Drosophila* and their hymenopterous parasitoids in orchards. *Phytoparasitica* 39, 429–435. <https://doi.org/10.1007/s12600-011-0180-6>.
- Denoirjean, T., G'eraldine, D., Cornille, A., Chen, X., Hance, T., Ameline, A., 2021. Genetic structure of *Malus sylvestris* and potential link with preference/performance by the rosy apple aphid pest *Dysaphis plantaginea*. *Sci. Rep.* 11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85014-x>.
- Deravel, J., Lemière, S., Coutte, F., Krier, F., Van Hese, N., B'échet, M., Sourdeau, N., Höfte, M., Leprêtre, A., Jacques, P., 2014. Mycosubtilin and surfactin are efficient, low ecotoxicity molecules for the biocontrol of lettuce downy mildew. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 6255–6264. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5663-1>.
- Desmyttere, H., Deweer, C., Muchembled, J., Sahmer, K., Jacquin, J., Coutte, F., Jacques, P., 2019. Antifungal activities of bacillus subtilis lipopeptides to Two *Venturia inaequalis* strains possessing different tebuconazole sensitivity. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02327>.
- Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J.-M., 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 81–106. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440>.
- Down, R.E., Gatehouse, A.M.R., Hamilton, W.D.O., Gatehouse, J.A., 1996. Snowdrop lectin inhibits development and decreases fecundity of the Glasshouse Potato Aphid (*Aulacorthum solani*) when administered in vitro and via transgenic plants both in laboratory and glasshouse trials. *J. Insect Physiol.* 42, 1035–1045. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(96\)00065-0](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(96)00065-0).
- Drewes, C.D., Zoran, M.J., Callahan, C.A., 1987. sublethal neurotoxic effects of the fungicide benomyl on earthworms (*Eisenia fetida*). *Pest. Sci.* 19, 197–208. <https://doi.org/10.1002/ps.2780190305>.
- Drogué, S., DeMaria, F., 2012. Pesticide residues and trade, the apple of discord? *Food Policy* 37, 641–649. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2012.06.007>.
- Druart, P., 1997. Optimization of culture media for in vitro rooting of *Malus domestica* Borkh. cv. Compact Spartan. *Biol. Plant* 39, 67–77.
- Febvay, G., Delobel, B., Rahbe, Y., 1988. Influence of the amino acid balance on the improvement of an artificial diet for a biotype of *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae). *Can. J. Zool.* 66, 2449–2453. <https://doi.org/10.1139/z88-362>.
- Franca S., Breda M., Barbosa D., et al., 2017. The sublethal effects of insecticides in insects.
- Geetha, I., Paily, K.P., Manonmani, A.M., 2012. Mosquito adulticidal activity of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis subsp. subtilis*. *Pest Manag. Sci.* 68, 1447–1450. <https://doi.org/10.1002/ps.3324>.

- Giordanengo, P., 2014. EPG-Calc: a PHP-based script to calculate electrical penetration graph (EPG) parameters. *Arthropod Plant Inter.* 8, 163–169. <https://doi.org/10.1007/s11829-014-9298-z>.
- Guez, J.-S., Vassaux, A., Larroche, C., Jacques, P., Coutte, F., 2021. New continuous process for the production of lipopeptide biosurfactants in foam overflowing bioreactor. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9, 678469 <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.678469>.
- Guo, D.-L., Wan, B., Xiao, S.-J., Allen, S., Gu, Y.C., Ding, L.S., Zhou, Y., 2015. Cyclic lipopeptides with herbicidal and insecticidal activities produced by *Bacillus clausii* DTM1. *Nat. Prod. Commun.* 10, 2151–2153. <https://doi.org/10.1177/1934578X1501001235> (10:1934578X1501001).
- Haynes, K.F., 1988. Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. *Annu Rev. Entomol.* 33, 149–168. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.33.010188.001053>.
- Heinze G., Ploner M., Jiricka L., 2020. logistf: firth's bias-reduced logistic regression, R package version 1.24. <https://CRAN.R-project.org/package=logistf>.
- Irwin M., Kampmeier G., Weisser W., 2007. Aphid movement: process and consequences, in: *Aphids as Crop Pests.* pp 153–186.
- Jang, J.Y., Yang, S.Y., Kim, Y.C., Lee, C.W., Park, M.S., Kim, J.C., Kim, I.S., 2013. Identification of Orfamide A as an insecticidal metabolite produced by *pseudomonas protegens* F6. *J. Agric. Food Chem.* 61, 6786–6791. <https://doi.org/10.1021/jf401218w>.
- Johnson R., Ellis M., Mullin C., Frazier M., 2010. Pesticides and honey bee toxicity –USA. <https://doi.org/101051/apido/201001841>. <https://doi.org/10.1051/apido/2010018>.
- Kim, P.I., Bai, H., Bai, D., Chae, H., Chung, S., Kim, Y., Park, R., Chi, Y.T., 2004. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. *J. Appl. Microbiol.* 97, 942–949. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02356.x>.
- Lechenet, M., Dessaint, F., Py, G., Makowski, D., Munier-Jolain, N., 2017. Reducing pesticide use while preserving crop productivity and profitability on arable farms. *Nat. Plants* 3, 1–6. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.8>.
- Ledieu, M.S., Helyer, N.L., 1983. Pyrazophos: a fungicide with insecticidal properties including activity against chrysanthemum leaf miner (*Phytomyza syngenesiae*) (Agromyzidae). *Ann. Appl. Biol.* 102, 275–279. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1983.tb02694.x>.
- LePage, K.T., Goeger, D., Yokokawa, F., Asano, T., Shioiri, T., Gerwick, W.H., Murray, T. F., 2005. The neurotoxic lipopeptide kalkitoxin interacts with voltage-sensitive sodium channels in cerebellar granule neurons. *Toxicol. Lett.* 158, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.03.007>.
- Li, Y., Ma, Y., Yang, L., Duan, S., Zhou, F., Chen, J., Liu, Y., Zhang, B., 2020. Effects of azithromycin on feeding behavior and nutrition accumulation of *Daphnia magna* under the different exposure pathways. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 197, 110573 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110573>.
- Liu, Y., Guo, R., Tang, S., Zhu, F., Zhang, S., Yan, Z., Chen, J., 2018. Single and mixture toxicities of BDE-47, 6-OH-BDE-47 and 6-MeO-BDE-47 on the feeding activity of *Daphnia magna*: from behavior assessment to neurotoxicity. *Chemosphere* 195, 542–550. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.045>.
- Liu, Y., Wang, Y., Zhang, J., Sun, L., Zhang, A., Torres, O.L., Guo, R., Chen, J., 2017. An integrated assessment of ceftazidime and photoproducts on the feeding behavior of rotifers:

- from exposure to post-exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 144, 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.06.039>.
- Liu, Y., Yan, Z., Zhang, L., Deng, Z., Yuan, J., Zhang, S., Chen, J., Guo, R., 2019. Food uptake and reproduction performance of *Daphnia magna* under the exposure of Bisphenols. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 170, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.106>.
- López-Isasmendi, G., Alvarez, A.E., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., Audisio, M.C., 2019. Aphicidal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* strains in the peach-potato aphid (*Myzus persicae*). *Microbiol. Res.* 226, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.05.006>.
- Maksimov, I.V., Singh, B.P., Cherepanova, E.A., Burkhanova, G.F., Khairullin, R.M., 2020. Prospects and applications of lipopeptide-producing bacteria for plant protection (review). *Appl. Biochem. Microbiol.* 56, 15–28. <https://doi.org/10.1134/S0003683820010135>.
- Mejri, S., Siah, A., Coutte, F., Magnin-Robert, M., Randoux, B., Tisserant, B., Krier, F., Jacques, P., Reignault, P., Halama, P., 2017. Biocontrol of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* using cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Environ. Sci. Pollut. Res Int* 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9241-9>.
- Mora, I., Cabrefiga, J., Montesinos, E., 2015. Cyclic lipopeptide biosynthetic genes and products, and inhibitory activity of plant-associated *Bacillus* against phytopathogenic bacteria. *PLoS One* 10, 0127738. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127738>.
- Mulligan, C.N., 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.* 133, 183–198. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.06.009>.
- Najar-Rodriguez, A., Walter, G., Mensah, R., 2007. The efficacy of a petroleum spray oil against *Aphis gossypii* Glover on cotton. Part 1: mortality rates and sources of variation. *Pest Manag. Sci.* 63, 586–595. <https://doi.org/10.1002/ps.1385>.
- Nasir, M.N., Besson, F., 2012. Interactions of the antifungal mycosubtilin with ergosterol-containing interfacial monolayers. *Biochim. Biophys. Acta BBA Biomembr.* 1818, 1302–1308. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.01.020>.
- Ongena, M., Jacques, P., 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16, 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>.
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.L., Thonart, P., 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol.* 9, 1084–1090. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>.
- Park, S.Y., Kim, J.-H., Lee, S.J., Kim, Y., 2013. Surfactin exhibits neuroprotective effects by inhibiting amyloid β -mediated microglial activation. *NeuroToxicology* 38, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2013.07.004>.
- Puterka, G., Farone, W., Palmer, T., Barrington, A., 2003. Structure-function relationships affecting the insecticidal and miticidal activity of sugar esters. *J. Econ. Entomol.* 96, 636–644. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-96.3.636>.
- Qubbaj, T., Reineke, A., Zebitz, C.P.W., 2005. Molecular interactions between rosy apple aphids, *Dysaphis plantaginea*, and resistant and susceptible cultivars of its primary host *Malus domestica*. *Entomol. Exp. Appl.* 115, 145–152.
- Rodríguez, M., Marín, A., Torres, M., B'ejar, V., Campos, M., Sampedro, I., 2018. Aphicidal Activity of surfactants produced by *Bacillus atrophaeus* L193. *Front. Microbiol.* 9, 3114. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03114>.

- Semlitsch, R.D., Foglia, M., Mueller, A., Steiner, I., Fioramonti, E., Fent, K., 1995. Short-term exposure to triphenyltin affects the swimming and feeding behavior of tadpoles. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 1419–1423. <https://doi.org/10.1002/etc.5620140819>.
- Sotherton, N.W., Moreby, S.J., Langley, M.G., 1987. The effects of the foliar fungicide pyrazophos on beneficial arthropods in barley fields. *Ann. Appl. Biol.* 111, 75–87. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1987.tb01435.x>.
- Stein, T., 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.* 56, 845–857. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>.
- Sutherland, A.M., Gubler, W.D., Parrella, M.P., 2010. Effects of fungicides on a mycophagous coccinellid may represent integration failure in disease management. *Biol. Control* 54, 292–299. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.05.020>.
- Thakur, N., Kaur, S., Tomar, P., Thakur, S., Yadav, A.N., 2020. Microbial biopesticides: current status and advancement for sustainable agriculture and environment. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, pp. 243–282.
- Tjallingii, W.F., 1985. Electrical nature of recorded signals during stylet penetration by aphids. *Entomol. Exp. Appl.* 38, 177–186. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1985.tb03516.x>.
- Tjallingii, W.F., Esch, T.H., 1993. Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals. *Physiol. Entomol.* 18, 317–328. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1993.tb00604.x>.
- Velkov, T., Dai, C., Ciccotosto, G.D., Cappai, R., Hoyer, D., Li, J., 2018. Polymyxins for CNS infections: pharmacology and neurotoxicity. *Pharm. Ther.* 181, 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.07.012>.
- Xie, X., Wen, Y., Niu, H., Shi, D., Zhang, Z., 2012. Re-feeding evokes reproductive overcompensation of food-restricted Brandt's voles. *Physiol. Behav.* 105 (3), 653–660.
- Yang, S.Y., Lim, D.J., Noh, M.Y., Kim, J.C., Kim, Y.C., Kim, I.S., 2017. Characterization of biosurfactants as insecticidal metabolites produced by *Bacillus subtilis* Y9. *Entomol. Res.* 47, 55–59. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12200>.
- Yun, D.C., Yang, S.Y., Kim, Y.C., Kim, I.S., Kim, Y.H., 2013. Identification of surfactin as an aphicidal metabolite produced by *Bacillus amyloliquefaciens* G1. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 56, 751–753. <https://doi.org/10.1007/s13765-013-3238-y>.

Effects of surfactins, *Bacillus* lipopeptides, on the behavior of an aphid and host selection by its parasitoid

Thomas Denoirjean,^a Arnaud Ameline,^{a*}  Aude Couty,^a Françoise Dubois,^a François Coutte^b and Géraldine Doury^a

^a UMR CNRS 7058 EDYSAN (Écologie et Dynamique des Systèmes Anthropisés), SFR Condorcet FR CNRS 3417, Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France

^b Université de Lille, UMRt 1158 BioEcoAgro - INRAE, équipe Métabolites secondaires d'origine microbienne, SFR Condorcet FR CNRS 3417, Institut Charles Viollette, Lille, France

* Corresponding Author

Abstract

BACKGROUND: Lipopeptides extracted from the *Bacillus* genus are emerging biopesticides, especially in protecting crops against phytopathogens. Among the three main families of lipopeptides, surfactins have been identified as having insecticidal properties against several insect orders. However, the sublethal effects of these promising biopesticides on insect pests and their natural enemies remain largely unknown. The aim of this study was to evaluate the effects of surfactins topically applied on black bean aphid *Aphis fabae* mortality. First, the effects of surfactins on aphid mortality were determined by delivering increasing concentrations to adults and nymphs. Second, the sublethal effects of surfactins on locomotor activity and feeding behavior of surviving aphids were evaluated using the electropenetrography method. Finally, the effect of host exposure to surfactins on host selection behavior by *Aphidius matricariae* parasitoid females was analyzed.

RESULTS: Four surfactins concentrations were studied (0.5, 1, 2.5 and 5 g L⁻¹). There was concentration-dependent mortality in response to surfactins at 24 h after treatment. Surfactins impacted aphid behavior when delivered at 1 g L⁻¹ by inducing a greater locomotor activity and a reduction in feeding activity. By contrast, at the third trophic level, exposure of aphid hosts

to surfactins did not affect behaviors leading to host recognition and acceptance by parasitoid females.

CONCLUSION: This study highlighted the consequences of aphid exposure to surfactins in the context of bottom-up regulation. Although surfactins could directly impact aphid behavior, they had no apparent consequences on the host selection behavior exhibited by parasitoid wasps.

Keywords

surfactins—sublethal effects; insect behavior; *Aphis fabae*; *Aphidius matricariae*; electropenetography

1. Introduction

The use of beneficial microorganisms as biopesticides represents promising safe and environmentally friendly crop protection management.¹ Lipopeptides obtained from numerous species of the *Bacillus* genus display a wide spectrum of biocide activities, targeting many microorganisms and more specially fungi.² Lipopeptides are composed of a cyclic hydrophilic peptide linked to a hydrophobic fatty acid chain and are classified into three different families: fengycins, iturins and surfactins. Lipopeptides are produced as a mixture of isoforms that may vary in the composition of their peptide cycle but most often in the length of their fatty acid chain. Surfactins are the most well-known lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) and represent a family that is found in almost all strains. Surfactins are produced alone or as a binary or tertiary mixture with lipopeptides from other families.³ Moreover, the ecotoxicity of surfactins is very low compared with their chemical counterparts⁴ and they are readily biodegradable.⁵ Fengycins and surfactins interfere with the structure of the cell membrane as they penetrate the lipid layer, inducing cell lysis when used at high concentrations.^{6,7} Despite similar modes of action, fengycins and surfactins differ in their biocide activity. For instance, surfactins show no marked antifungal efficiency compared with fengycins.⁸ Iturins are also able to interact with biological membranes, and their antifungal properties are related to specific interaction with the ergosterol content of the biological membrane.⁹ They also have hemolytic properties⁹ based on osmotic perturbation due to the formation of ion-conducting pores.¹⁰ These lipopeptides alone (fengycins and iturins) or in a mixture (fengycins/surfactins or iturins/surfactins) have recently demonstrated good efficacy against the apple scab *Venturia inaequalis* (G. Winter).¹¹

Lipopeptides from various *Bacillus* species are active against a wide spectrum of insects, making them promising bio-insecticides, as long as their unintended effects on non-target organisms remain limited. Their insecticidal activities are generally achieved by using cocktails

of several molecules, either following ingestion^{12–14} or topical contact,¹⁵ inducing damage on midgut tissues and cuticle modification, respectively. Among lipopeptides, surfactins have been shown to induce mortality in insects belonging to different orders such as Lepidoptera (moths¹⁶), Diptera (mosquitoes,¹⁷ fruitflies¹⁸) and Hemiptera (aphids^{16,19,20}). These different studies also revealed that the insecticidal activity of surfactins varied depending on the concentration and isomer used. Because surfactins can trigger sufficient insecticidal activity when used alone, they represent the most promising insecticidal candidates.

Besides their known insecticidal potential at given concentrations, the sublethal effects of lipopeptides on insect pests and their natural enemies remain largely unknown. Sublethal effects are defined as modifications of the behavior or fitness of individuals who survived exposure to a toxic compound.²¹ Concerning insect pests, lipopeptide exposure may alter their preference/performance towards their host plants, as shown with the use of conventional pesticides.^{22,23} Regarding natural enemies, the sublethal effects of pesticides may impair their potential natural regulation of pests.^{24–26} However, information regarding the effects of insecticides on the behavior of insects remains relatively scarce.^{27,28} Moreover, in most studies, sublethal impacts are generally studied on either the behavior of the pest or the behavior of its natural enemy, but rarely on both.

The purpose of the current work was to evaluate the sublethal effects of surfactins exposure on the behavior of an aphid pest and the consequences on the host preference of one of its parasitoids. The aphid model selected was the black bean aphid *Aphis fabae* (Scopoli), because it is a common polyphagous aphid pest of European agricultural crops that is also a vector of numerous phytoviruses. The chosen parasitoid was a commercially available aphid natural enemy, the generalist endoparasitoid *Aphidius matricariae* (Haliday) known to parasitize at least 40 aphid species.²⁹ First, the effects of surfactins on aphid mortality were determined by delivering, via topical exposure, increasing concentrations of surfactins to adults and nymphs. Second, the surfactins concentration determined as sublethal on adults was evaluated for its effects on aphid behavior, in terms of the locomotor activity of both adults and nymphs, and feeding activity of adults. Finally, we studied whether *A. matricariae* females would be able to discriminate between aphid nymph hosts exposed or not to surfactins.

2. Materials and methods

2.1. Plants and insects

Plantlets used in the experiments were obtained from *Vicia faba* (cv. "Axel") seeds. They were grown for 3 weeks in plastic pots (60 × 60 × 70 mm) with commercial sterilized potting soil (Botanic, reference: 386895, 86.50 g per pot) in a climate-controlled room (20 ± 1°C, 60 ± 5% relative humidity (RH), and a 16:8 h light/dark photoperiod at 2 klx).

The colony of *Aphis fabae* was initiated from a single apterous parthenogenetic female provided in 2018 by the UCL (Leuven, Belgium) and maintained in ventilated plastic cages (360 × 240 × 110 mm; Enseignes Picardes) in a climate-controlled room (20 ± 1°C, 60 ± 5% RH and a 16:8 h light/dark photoperiod at 2 klx) to induce parthenogenesis. Cohorts of synchronized *Aphis fabae* nymphs were reared in 90-mm diameter plastic Petri dishes containing leaves of *V. faba* embedded in 1.5% agar (w/v) under the controlled conditions described above, until they were used in the experiments. Nymphs were obtained by placing parthenogenetic adult females on plantlets for 24 h before removing them. Third-instar nymphs and young adults (4- and 9-day-old aphids, respectively) were selected for bioassays.

Aphidius matricariae parasitoids were obtained from Viridaxis as mummies. The commercial line of *A. matricariae* had not been reared on *Aphis fabae* or on *V. faba*. Upon reception, mummies were transferred to plastic tubes (75 × 13 mm) closed with a cotton plug. Once emerged, parasitoids were sexed and mating was allowed for 48 h by grouping two to three females with two males in the same plastic tube (75 × 13 mm). Aphids were fed ad libitum with a 1:1 honey/water (v/v) solution until used in experiments. Parasitoids were maintained in a climate chamber (Panasonic, Versatile Environmental Test Chamber MLR-352H, 294 L) at 20 ± 1°C, 60 ± 5% RH and a 16 h light/dark photoperiod. Three-day-old standardized parasitoid females (mated, fed and without oviposition experience) were used in the laboratory experiments.

2.2. Surfactins production and purification

Surfactins were produced by *Bacillus subtilis* BBG131 in shaken flasks according to Coutte *et al.*³⁰ and then purified and extracted using ultrafiltration with four steps of sequential diafiltration according to Coutte *et al.*³¹ At the end of the process surfactins were freeze-dried. The purity of the surfactins powder was evaluated using Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) as described below. The composition of the surfactins produced by strain BBG131 has previously been analyzed by mass spectrometry and published.³² Surfactins isoforms are composed of fatty acids of differing chain length from C 12 to C 16 carbons.

Surfactins solutions were prepared by solubilizing surfactins powder (75%) at 20°C in a 5% dimethylsulfoxide and 0.2% HELIOSOL® (ActionPin) stirred solution at concentrations of 0.5, 1, 2.5 and 5 g L⁻¹. The control solution was made from ultrapure water also in 5% dimethylsulfoxide and 0.2% HELIOSOL stirred solution. Addition of HELIOSOL is justified by the fact that it is an adjuvant very often used for the treatment of different crops and especially for apple trees. Surfactins powders and solutions were analyzed by reverse-phase high-performance liquid chromatography using a C18 column on Acquity UPLC system (Waters) with an acetonitrile/water/ Tri-Fluoroacetic Acid (TFA) 80:20:0.5 (v/v/v). The flow rate was 0.6 ml min⁻¹, and the detection wavelength was 214 nm. Purified surfactins supplied by Sigma Aldrich was used as standard. The retention time and second derivative of the

absorption spectrum between 200 and 400 nm were used to identify the eluted molecules (Empower software, Waters).

2.3. Aphid exposure to surfactins

Using an Eppendorf micropipette (0.1–2.5 μl), 0.2 μl of surfactins solution or control solution was applied topically onto the abdomen of young aphid adults. To avoid nymphs drowning in the solution droplet, the volume applied to the abdomen of third-instar nymphs was 0.15 μl . After topical application, aphids were left for 1 h in the Petri dish in which they had been treated, to allow the solution to penetrate the cuticle and to estimate their immediate mortality. Surviving aphids were then transferred to a 90-mm diameter plastic Petri dish containing *V. faba* leaves embedded in 1.5% agar, in which they were kept for 24 h before being used in behavioral and physiological bioassays. All the experiments were conducted at $20 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 5\%$ RH and a 16:8 h light/dark photoperiod.

2.4 Aphid mortality and determination of the sublethal concentration on adults

The purpose of this experiment was to evaluate the effect of surfactins on the mortality of aphids at two different time scales. Four different concentrations were tested (0.5, 1, 2.5 and 5 g L^{-1}) and applied to aphids by topical contact as described above. One hour after topical application (that is, before transferring aphids to Petri dishes containing *V. faba* leaves), the percentage of mortality at 1 h (here defined as the mortality occurring within 1 h following the exposure) was assessed as the number of dead aphids divided by the number of treated aphids. At 24 h after topical application, the percentage of mortality was calculated as the total number of dead aphids (number of aphids recorded dead both at 1 h and 24 h after exposure) divided by the total number of aphids initially treated.

Determination of the sublethal concentration was based on mortality experiments on adults. It was conventionally selected according to the definition of Desneux *et al.* 25 as the concentration inducing no significant mortality in the treated population. A concentration of 1 g L^{-1} was therefore used to study the sublethal effect on aphids of exposure to surfactins in all subsequent experiments.

2.5 Aphid locomotor activity

To study the sublethal effect of exposure to surfactins (1 g L^{-1}) on the locomotor behavior of *Aphis fabae* nymphs and adults, the dispersion behavior and velocity of aphids pre-exposed to the control or surfactins solution were monitored on a target arena according to the methodology of Chesnais *et al.*³³ (Figure 1). One single aphid was deposited in the center of an experimental

arena (285 mm diameter), divided into ten concentric circles (“spatial zones”) 15 mm apart. Each aphid was deposited on a transparent glass plate placed on top of the arena, which allowed cleaning of the glass surface with ethanol and then water every five recordings. To minimize external stimuli, the arena was positioned between four white foam cardboard “walls” (45 cm high). For each aphid, the time taken to cross one particular spatial zone for a maximum of 300 s (“velocity” parameter) and the maximum zone reached (“dispersion” parameter) were determined. The test was completed (i) if the aphid crossed the 10th spatial zone and left the arena, or (ii) at the end of the 300 s. All aphids staying in the introduction circle for the whole 300 s were considered “non-responding”. A total of 60 nymphs and 28 adults were used for the control treatment, and 64 nymphs and 28 adults for the surfactins treatment. Results were analyzed for the responding adults and nymphs (that is, 43 nymphs and 23 adults for control aphids, and 31 nymphs and 25 adults for surfactins treated aphids).

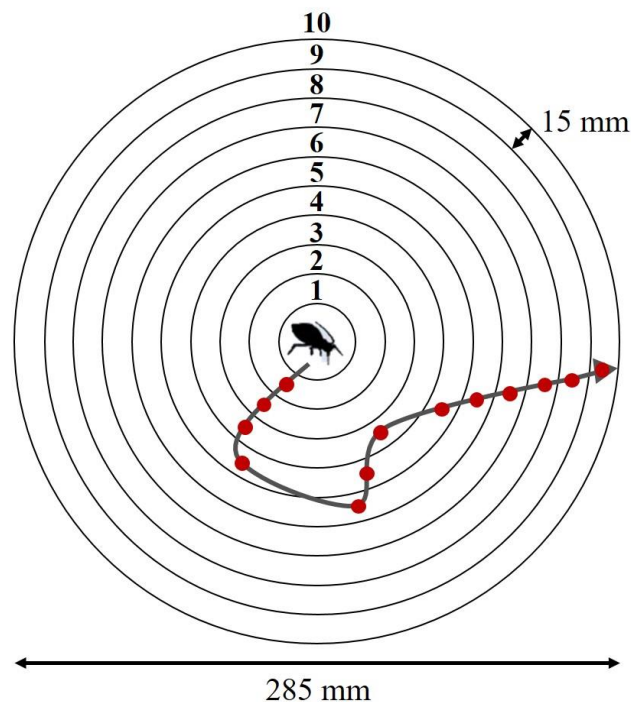


FIGURE 1 Bioassay set-up used, adapted from Chesnais *et al.*,³³ to record the dispersion behavior and locomotor activity of aphids in a paper arena covered with a square glass plate. Gray line: example of an aphid path observed on the arena for 300 s. Red dots: number of spatial zones into which the aphid entered. The maximum spatial zone reached was considered a “dispersion” parameter. The “velocity” parameter was equal to the mean time taken to cross a given spatial zone.

2.6. Aphid feeding behavior

The aim of this experiment was to study the sublethal effect of exposure to surfactins (1 g L^{-1}) on aphid adult feeding behavior. This was done using the electrical penetration graph (EPG) method.³⁴ An electrode consisting of a 2-cm long copper wire soldered to the head of a 2.2-mm diameter brass nail was used to wire the insects. The other end of the electrode consisted of a thin 20- μm diameter and 2-cm long gold wire glued to the copper wire portion of the electrode. A droplet of conductive water-based silver glue was used to attach the gold wire to the copper wire of the electrode and another was deposited on the abdomen of aphids to attach them to the extremity of the gold wire with silver glue (both provided by EPG Systems). Eight individual aphids were connected to the Giga-8 DC-EPG amplifier (EPG Systems), each placed on the abaxial side of a leaf of an individual plant. Recordings were performed continuously for 8 h during the photophase inside a Faraday cage, under controlled conditions of $20 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 5\%$ RH and a 16:8 h light/dark photoperiod. EPG data were digitized using a DatQ Instruments DI-710-UH analog-to-digital board and recorded using Stylet + software (EPG Systems), at a sample rate of 100 Hz, input impedances (R_i) of 10⁹ ohms (Ω), and DC substrate voltage. Analysis of the EPG waveforms was carried out using Stylet + software. Parameters from the recorded waveforms were calculated with EPG-Calc version 6.1.7 software.³⁵ Parameters were based on different EPG waveforms³⁶ corresponding to: total stylet probing activity within plant tissues; phloem activity (salivation within phloem vessels and phloem sap ingestion); xylem sap ingestion; and stylet derailment. A total of 24 plants per treatment were used for the EPG measurements. EPG records were obtained from 37 and 31 aphids exposed to the control or 1 g L^{-1} surfactins solution, respectively.

2.7. Host recognition and acceptance by parasitoid females

The aim of this experiment was to evaluate whether *A. matricariae* females would be able to discriminate between aphid nymph hosts exposed to surfactins and nymph hosts exposed to the control solution. One standardized *A. matricariae* female was introduced into a test arena, as described by Chesnais *et al.*³⁷ The test arena consisted of a 90-mm diameter plastic Petri dish, containing one *V. faba* leaf embedded in 1.5% agar onto which 20 pre-exposed nymphs (ten exposed to 1 g L^{-1} surfactins solution, ten exposed to the control solution) had been deposited 1 h before the start of the experiment. A droplet of water-based paint (blue or red) was deposited on the abdomen of the aphid to discriminate between nymphs exposed to surfactins and control. Colors were permuted each day to avoid an effect of color on host selection by the parasitoid female. Observations started immediately upon deposition of the parasitoid female and lasted for 10 min. The time before the first recorded behavioral item (latency time) and the first choice (aphid with which the parasitoid female first interacted) were noted. The frequency and sequence of the following behavioral items were then recorded: antennal examination (AE), abdomen bending (AB) and ovipositor insertion (OI).³⁸ Ovipositor insertion was recorded

whenever a parasitoid female made physical contact with an aphid using its ovipositor, while exhibiting an oviposition stance (abdomen bending). For the analysis, the behaviors were regarded as a series of events and only the final event was recorded (for example, if a wasp had antennated an aphid and then bent its abdomen, this was noted as AB and not as AE + AB). To assess the proportion of OI resulting in true oviposition (OV), all stung aphids were dissected in a drop of NaCl solution (9‰) under a stereomicroscope to calculate the rate of oviposition ($\%_{OV} = \text{number of OV}/\text{number of OI}$). Thirty replicates were made in total for each treatment.

2.8. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R software version 3.6.2 (The R Foundation, <https://www.r-project.org/>). The effect of surfactins on aphid mortality (adult and third-instar nymphs), at 1 and 24 h, was analyzed using a chi-square test of homogeneity followed by pairwise comparisons between treatments using chi-square tests (control, 0.5, 1, 2.5 and 5 g L⁻¹), with a Bonferroni test for multiple comparisons.

The impact of 1 g L⁻¹ of the selected surfactins concentration on aphid locomotor and feeding behavior was then assessed by carrying out a Monte Carlo permutation test (999 replicates) to test for the significance of the differences of the median of each parameter between controls and treated aphids. The effect of the surfactins treatment at the 1 g L⁻¹ concentration on the percentage on non-responding aphids was assessed by using a chi-square test.

Regarding parasitoids, the difference of latency time between treated and untreated hosts was compared using the Cox proportional hazards regression model, which is adapted to treat time-dependent parameters. The assumption of validity of proportional hazards was validated using the function “coxph” (package R: “survival”, version 3.1.8: <https://github.com/therneau/survival>). The first choice of the parasitoid females as well as the rate of oviposition towards treated and untreated hosts were compared using a chi-square test. Parasitoid attack rate parameters (AE, AB, OE) towards treated and untreated hosts were compared using a Mann–Whitney test because the data were not normally distributed and homoscedasticity was not respected.

3. Results

3.1. Aphid mortality

The percentage mortality of *Aphis fabae* adults and nymphs after exposure to surfactins at four different concentrations is summarized in Table 1. Regarding adults, only the greatest surfactins concentration (5 g L⁻¹) induced approximately 40% mortality at 1 h in the treated aphids (χ^2

test, $\chi^2 = 39.03$, $p < 0.001$). Percentage mortality at 24 h was significantly greater in aphids exposed to 2.5 and 5 g L⁻¹ surfactins concentrations, reaching respectively approximately 60 and 80% (2.5 g L⁻¹ versus control: χ^2 test, $\chi^2 = 25.69$, $p < 0.001$; 5 g L⁻¹ versus control: χ^2 test, $\chi^2 = 63.25$, $p < 0.001$). Both the 0.5 and 1 g L⁻¹ surfactins concentrations induced mortalities in adults that were not significantly different compared with controls. Thus these two concentrations could be considered sublethal, as defined by Desneux *et al.*²⁵ To carry out all behavioral bioassays, we selected the greatest concentration tested that did not significantly impact adult mortality, that is, 1 g L⁻¹.

TABLE 1 Effect of the concentration of surfactins on mortality rates of *Aphis fabae* topically treated at two different life stages (third-instar nymphs and adults)

		Control	0.5 g/L	1 g/L	2.5 g/L	5 g/L
Adults	<i>P</i>	(<i>n</i> =41)	(<i>n</i> =40)	(<i>n</i> =65)	(<i>n</i> =47)	(<i>n</i> =74)
Mortality at 1 h (%)	<0.001	7.32 a	10.00 a	9.23 a	4.26 a	39.19 b
Mortality at 24 h (%)	<0.001	21.95 a	20.00 a	32.31 ab	57.45 bc	78.38 c
Nymphs	<i>P</i>	(<i>n</i> =66)	(<i>n</i> =60)	(<i>n</i> =67)	(<i>n</i> =59)	(<i>n</i> =59)
Mortality at 1 h (%)	<0.001	4.55 a	21.67 b	17.91 ab	35.59 b	79.66 c
Mortality at 24 h (%)	<0.001	22.73 a	38.33 b	53.73 bc	69.49 c	94.92 d

The percentage mortality at 1 h corresponds to the number of aphids dead within 1 h divided by the number of aphids initially treated, and the percentage mortality at 24 h corresponds to the total number of aphids dead within 24 h after exposure divided by the number of aphids initially treated. Percentages in the same line followed by the same letter are not significantly different following post-hoc tests ($p > 0.05$, χ^2 tests with Bonferroni correction).

Concerning exposed nymphs, although all mortalities at 1 h tended to be overall greater compared with controls for all surfactins concentrations, differences from controls were significant for 0.5, 2.5 and 5 g L⁻¹ (χ^2 test, $\chi^2 = 95.52$, $p < 0.001$). Percentage mortality values at 24 h ranged from approximately 38% (0.5 g L⁻¹) to approximately 95% (5 g L⁻¹), and revealed a concentration-dependent lethality of surfactins (χ^2 test, $\chi^2 = 77.53$, $p < 0.001$).

3.2. Aphid locomotor activity

Adult aphid velocity was significantly greater following exposure to surfactins and it doubled compared with aphids exposed to the control solution (hereafter referred as “controls”) (Figure 2). Indeed, the time taken to cross one particular spatial zone was half that in adults exposed to surfactins compared with controls, respectively 15.46 ± 2.03 and 37.07 ± 6.58 s (Monte Carlo permutation test, $p = 0.008$). Adult dispersion (that is, the maximum zone reached) was also significantly greater following surfactins topical exposure compared with controls. On average, adult aphids exposed to surfactins reached the ninth zone, whereas controls reached the sixth zone (Monte Carlo permutation test, $p = 0.003$). The percentage of non-responding aphids was not statistically different between controls and adults exposed to surfactins, 18% and 11% respectively (χ^2 test, $\chi^2 = 0.14$, $p = 0.70$).

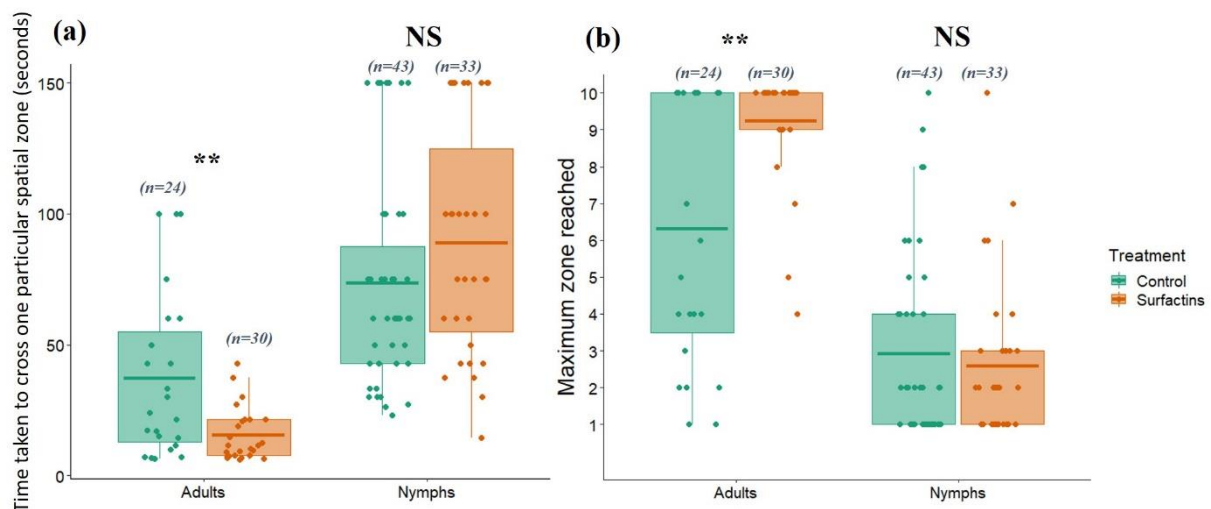


FIGURE 2 Locomotor activity of *Aphis fabae* adults and third-instar nymphs topically exposed to the control or 1 g L^{-1} surfactins solution. (a) Mean time taken to cross one particular spatial zone (s) and (b) maximum zone reached. Box plots show mean (line) and 25–75% percentiles (box). Asterisks indicate a significant difference between aphids exposed to control and surfactins solutions, whereas the ‘NS’ label indicates an absence of significant difference (Monte Carlo permutation test, ** $p < 0.005$; NS, $p > 0.05$).

Regarding nymphs, no difference in velocity (Monte Carlo permutation test, $p = 0.21$) or dispersion (Monte Carlo permutation test, $p = 0.99$) was observed between controls and aphids exposed to surfactins. The percentage of non-responding nymphs was significantly greater in the surfactins treated group (52%) than in the control group (28%) (χ^2 test, $\chi^2 = 6.01$, $p = 0.014$).

3.3. Aphid feeding behavior

The duration of total stylet probing activity within plant tissues was not significantly different between aphids exposed to surfactins and controls (Monte Carlo permutation test, $p = 0.18$), and lasted *ca.* 390 min (Figure 3a). The duration of phloem activity (salivation within phloem vessels and phloem sap ingestion) was 1 h shorter for aphids exposed to surfactins compared with controls (Monte Carlo permutation test, $p = 0.028$; Figure 3b). The mean duration of xylem sap ingestion was significantly longer for aphids exposed to surfactins (80.19 ± 10.58 min) compared with controls (52.76 ± 10.30 min) (Monte Carlo permutation test, $p = 0.042$; Figure 3c). Finally, the duration of stylet derailment was significantly longer for aphids exposed to surfactins (84.99 ± 11.44 min) compared with controls (67.77 ± 26.16 min) (Monte Carlo permutation test, $p = 0.029$; Figure 3d).

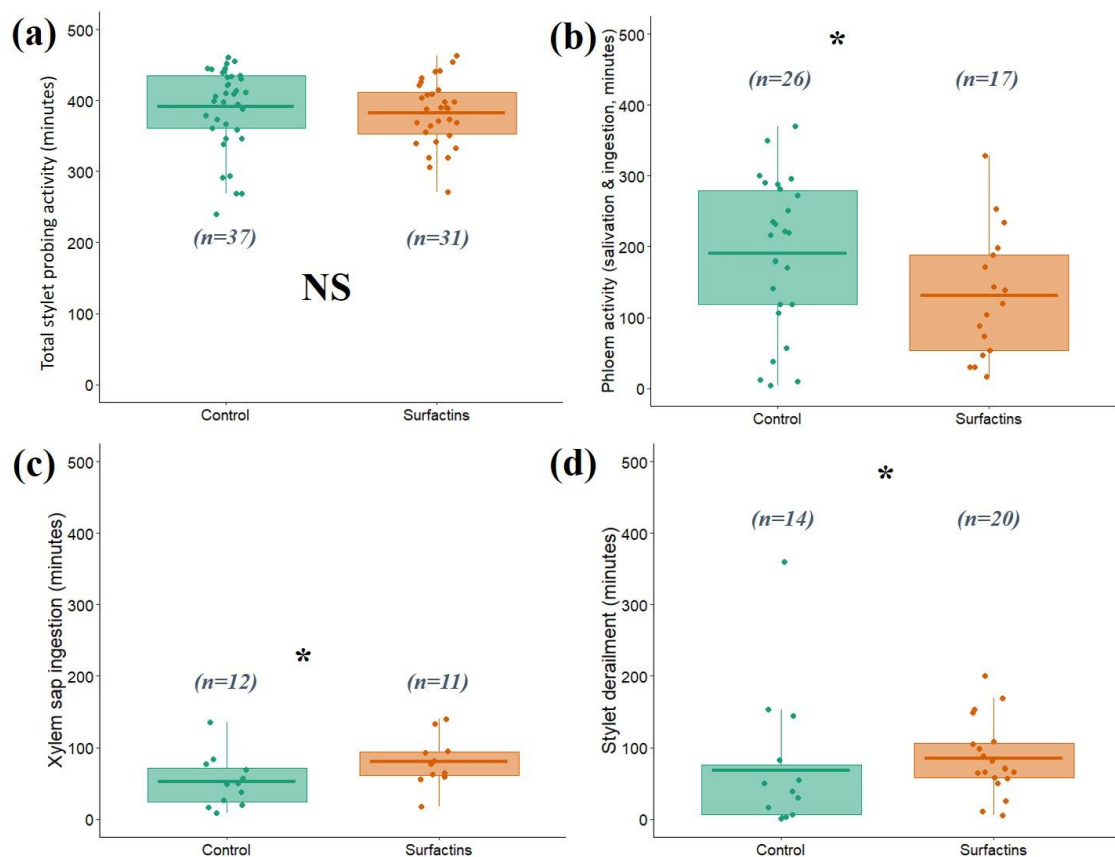


FIGURE 3 Feeding behavior parameters of *Aphis fabae* adults topically exposed to the control or the 1 g L^{-1} surfactins solution. (a–d) Duration of: (a) total stylet probing activity within plant tissues, (b) phloem activity (both salivation and ingestion), (c) xylem sap ingestion and (d) stylet derailment. Box plots show mean (line) and 25–75% percentiles (box). Asterisks indicate a significant difference between aphids exposed to control and surfactins solutions (Monte Carlo permutation test, $*p < 0.05$).

3.4. Host recognition and acceptance by parasitoid females

Results revealed that neither host recognition nor host acceptance by *A. matricariae* were significantly affected by the exposure of nymphs to surfactins (Table 2). Whether aphids were exposed to the surfactins or to the control solution, no significant difference could be observed for the first choice of aphid host by *A. matricariae* females (χ^2 test, $\chi^2 = 0.13$, $df = 1$, $p = 0.72$), latency times (Cox proportional hazards model, $\chi^2 = 0.04$, $df = 1$, $p = 0.85$), numbers of antennal examination (Mann–Whitney, $U = 164.5$, $p = 0.43$), abdomen bending (Mann–Whitney, $U = 84.5$, $p = 0.68$) and ovipositor insertion (Mann–Whitney, $U = 142.5$, $p = 0.84$). Finally, the percentages of eggs actually deposited after an ovipositor insertion were not significantly different between exposed and control aphids (χ^2 test, $\chi^2 = 0.45$, $df = 1$, $p = 0.50$).

TABLE 2 Host recognition and acceptance behavior of *Aphidius matricariae* females on *Aphis fabae* third-instar nymphs exposed to the control or 1 g L⁻¹ surfactins solution

Behavioral parameters	p-value	Control (<i>n</i> = 30)	Surfactins (<i>n</i> = 30)
Latency time (s; mean + SEM)	χ^2 (CPH): NS	161.31 ± 30.91	184.71 ± 31.16
1 st choice	χ^2 : NS	16	14
AE (mean + SEM)	Mann-Whitney: NS	3.00 ± 0.57	2.60 ± 0.46
AB (mean + SEM)	Mann-Whitney: NS	1.63 ± 0.36	1.77 ± 0.36
OI (mean + SEM)	Mann-Whitney: NS	1.17 ± 0.24	1.13 ± 0.21
%_OV	χ^2 : NS	85.71%	76.47%

Abbreviations: AB, number of abdomen bending; AE, number of antennal examination; OI, number of ovipositor insertion; %_OV, percentage of true oviposition. p-values are given for each specific test carried out: χ^2 (CPH), Cox proportional hazard model; χ^2 , chi-square test and Mann–Whitney tests. ‘NS’ indicates an absence of significant difference in the behavior of the female parasitoids between aphid host nymphs exposed to the 1 g L⁻¹ surfactins solution and controls ($p > 0.05$).

4. Discussion

This is the first study investigating the effects of lipopeptides on the behavior of both an insect pest and one of its natural enemies. To represent a field context in which whole colonies would be sprayed, we investigated the effects of surfactins topical applications on both nymphs and adults. A concentration-dependent lethality of surfactins on the black bean aphid pest *Aphis fabae* was revealed within 24 h when applied topically, especially for nymphs. At the 1 g L⁻¹

concentration studied, surfactins significantly impacted aphid behavior in terms of locomotor and feeding activity. In contrast, concerning the third trophic level, *A. matricariae* females host choice was not affected because they did not discriminate between surfactins-exposed nymphs and controls.

This study revealed a clear effect of surfactins on the mortality of *Aphis fabae*, which confirmed the aphicidal properties of lipopeptides described on *Myzus persicae* (Sulzer) and *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus).^{15,19,20} In our study, concentrations of 1 and 2.5 g L⁻¹ induced mortality at 24 h after exposure in approximately 50% of the treated nymphs or adults, respectively. The capacity of lipopeptides to interfere with the lipid layer could explain their topical aphicidal properties.⁸ Indeed, Rodríguez *et al.*¹⁵ showed via microscopy data that topical exposure to *Bacillus atrophaeus* (Nakamura) surfactants, which contained the three families of lipopeptides and mainly surfactins (90% or more), altered the cuticle of *R. padi*. They hypothesized that exposure of aphids to surfactants led to perturbations of the cuticle, because its thickness was reduced and clear evidence of damage was observed.¹⁵ Surfactants from *Pseudomonas* sp. Showed similar activities on *M. persicae*.^{39,40}

Our study clearly revealed that surfactins treatment altered aphid adult behavior at the 1 g L⁻¹ concentration used. Concerning locomotor behavior, the velocity and dispersion of treated aphids were greater compared with controls. Pesticides or surfactants, via their neurotoxic effects, may induce such behavioral modifications.^{41,42} Some lipopeptides are known to have contrasting effects on animals nervous system, either toxic^{43,44} or protective.⁴⁵ Although under field conditions increased locomotion in adult aphids could enhance their potential to colonize new host plants and propagate viruses, it could also increase their probability of escaping natural enemies.⁴⁶ Concerning aphid feeding behavior, the duration of total stylet probing activity within plant tissues was not affected by surfactins exposure. However, the ratio of phloem sap ingestion to the global activity was reduced. Phloem sap ingestion is considered one of the last steps of host plant acceptance by aphids,⁴⁷ thus surfactins may perturb host plant colonization by aphids. This is congruent with the results of Rodríguez *et al.*¹⁵ who demonstrated that treatment of the aphid *R. padi* with surfactants (mostly containing surfactins) of *B. atrophaeus* L193 induced a reduction in their feeding activity through a decrease in honeydew excretion. Our results showed that aphids exposed to surfactins did ingest xylem sap for a greater duration than controls at the expense of phloem sap ingestion. Xylem sap ingestion can occur to overcome hydric stress, as demonstrated on *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) aphids following exposure to mineral oil.⁴⁸ The fact that cuticle dehydration may be induced by the interaction between surfactants and membrane molecules such as phospholipids and fatty acids^{39,40} could partly explain the aphid need for rehydration recorded in our study. Finally, exposure of aphids to surfactins induced a longer duration of stylet derailment. Surfactins treatment seemed to have stimulated the mechanics of stylet derailment, which could have partially impacted the accessibility of aphid stylets to the phloem vessels and, consequently, the shorter duration of phloem sap ingestion recorded.

Finally, contrary to the sublethal behavioral effects observed on the second trophic level, no cascade effect of surfactins was recorded on host selection by parasitoid females. Faced with a choice between a surfactins-treated or a control host, parasitoid females exhibited similar host recognition and acceptance in terms of behavioral patterns. To our knowledge, the few studies investigating the effect of host exposure to insecticides revealed contrasting effects on parasitoid host selection. Whereas host exposure to pesticides may reduce parasitoid attack rate,⁴⁹ our results are congruent with studies highlighting a lack of discrimination in terms of parasitoid oviposition behavior between exposed and unexposed hosts.^{50,51} Alongside chemical cues, parasitoids use physical traits such as color or shape to locate their hosts.^{52,53} Among these physical signals, host locomotion often represents a necessary stimulus for female parasitoids to initiate host contact/attack.^{54–56} Because no difference in terms of velocity or dispersion could be observed between *Aphis fabae* nymphs exposed to surfactins and controls, the lack of locomotor cues from the aphid hosts could have contributed to the absence of discrimination in *A. matricariae* parasitoid females during the host selection process. It should also be noted that the surfactins-treated aphid nymphs showed a significantly greater number of non-responding individuals. Although it is possible that the reason behind this significant difference was that the concentration of surfactins used caused a higher level of mortality in treated nymphs than the control, this had no impact on female parasitoid host choice.

5. Conclusion

Most of the antifungal preparations derived from *Bacillus* that are already on the phytosanitary market or will be available in the coming years contain surfactins. This study confirms their potential usefulness to control aphid populations in the field due to the insecticidal effects of surfactins on both adult and nymph instar aphids, but also in view of the sublethal behavioral changes recorded in treated adults. The side effects of surfactins on food-webs are thus important to consider within agrosystems crops and/or orchards. In particular, it would be interesting to evaluate the potential impact of increased aphid movement on their propensity to spread phytoviruses. In the context of bottom-up regulation, this study highlighted that the indirect effects of surfactins on exposed aphids had no apparent consequences on host selection behavior exhibited by parasitoid wasps. However, although the potential of natural regulation of aphid colonies surviving surfactins treatment by wasps seemed to have not been affected, further studies on aphid life history traits are needed. Indeed, should parasitoid performance traits impacting their fitness be revealed, this could ultimately affect their efficiency as natural enemies. Finally, to assess the effect of surfactins on top-down regulation, future work could also investigate the direct effect of surfactins on parasitoids behavior and life history traits following topical exposure on mummies.

Acknowledgments

This work was supported by the project PROVERBIO (Protection of orchards by biological control: an adapted selection of auxiliaries) financed by the European Union, under the scope of the FEDER program and INTERREG initiative: Programme 2014 - 2020 INTERREG V-A Belgium - France (France - Wallonie - Vlaanderen). This work was also supported by the funding from the AgriBioPOM research program and from the ALIBIOTECH program funding administered by the Hauts-de-France Region. We thank the UCL for providing the clone of *Aphis fabae*, and Viridaxis, S. A. for providing us with *Aphidius matricariae* mummies. Yvelise Fourdrain is thanked for her technical assistance. We thank Marie-Pierre Boley for her help with the administrative tasks. Michel Yvon is thanked for the locomotor behavior set-up, and Andrew Roots for the critical reading of the English.

Conflict Of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

References

- 1 Kachhawa D, Microorganisms as a biopesticides. *J Entomol Zool Stud* 5: 468–473 (2017).
- 2 Maksimov IV, Singh BP, Cherepanova EA, Burkhanova GF and Khairullin RM, Prospects and applications of lipopeptide-producing bacteria for plant protection (review). *Appl Biochem Microbiol* 56: 15–28 (2020).
- 3 Jacques P, Surfactin and other lipopeptides from *bacillus spp*, in *Biosurfactants: From Genes to Applications*, ed. by Soberón-Chávez G. Springer, Berlin, pp. 57–91 (2011). https://doi.org/10.1007/978-3-642-14490-5_3.
- 4 Deravel J, Lemièrre S, Coutte F, Krier F, van Hese N, Béchet M *et al.*, Mycosubtilin and surfactin are efficient, low ecotoxicity molecules for the biocontrol of lettuce downy mildew. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:6255–6264 (2014).
- 5 Mulligan CN, Environmental applications for biosurfactants. *Environ Pollut* 133:183–198 (2005).
- 6 Deleu M, Paquot M and Nylander T, Fengycin interaction with lipid monolayers at the air–aqueous interface—implications for the effect of fengycin on biological membranes. *J Colloid Interface Sci* 283:358–365 (2005).

- 7 Heerklotz H and Seelig J, Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin. *Eur Biophys J* 36:305–314 (2007).
- 8 Ongena M and Jacques P, *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol* 16:115–125 (2008).
- 9 Pérez-García A, Romero D and de Vicente A, Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *bacilli* in agriculture. *Curr Opin Biotechnol* 22:187–193 (2011).
- 10 Aranda FJ, Teruel JA and Ortiz A, Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin a. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* 1713:51–56 (2005).
- 11 Desmyttere H, Deweer C, Muchembled J, Sahmer K, Jacquin J, Coutte F *et al.*, Antifungal activities of *Bacillus subtilis* lipopeptides to two *Venturia inaequalis* strains possessing different tebuconazole sensitivity. *Front Microbiol* 10:1–10 (2019).
- 12 Ghribi D, Elleuch M, Abdelkefi L and Ellouze-Chaabouni S, Evaluation of larvicidal potency of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant against *Ephesia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae and influence of abiotic factors on its insecticidal activity. *J Stored Prod Res* 48:68–72 (2012).
- 13 Ben Khedher S, Boukedi H, Kilani-Feki O, Chaib I, Laarif A, Abdelkefi-Mesrati L *et al.*, *Bacillus amyloliquefaciens* AG1 biosurfactant: putative receptor diversity and histopathological effects on *Tuta absoluta* midgut. *J Invertebr Pathol* 132:42–47 (2015).
- 14 Ben Khedher S, Boukedi H, Dammak M, Kilani-Feki O, Sellami-Boudawara T, Abdelkefi-Mesrati L *et al.*, Combinatorial effect of *Bacillus amyloliquefaciens* AG1 biosurfactant and *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 toxin on *Spodoptera littoralis* larvae. *J Invertebr Pathol* 144:11–17 (2017).
- 15 Rodríguez M, Marín A, Torres M, Béjar V, Campos M and Sampedro I, Aphicidal activity of surfactants produced by *Bacillus atrophaeus* L193. *Front Microbiol* 9:3114 (2018).
- 16 Guo D-L, Wan B, Xiao SJ, Allen S, Gu YC, Ding LS *et al.*, Cyclic lipopeptides with herbicidal and insecticidal activities produced by *Bacillus clausii* DTM1. *Nat Prod Commun* 10:2151–2153 (2015).
- 17 Geetha I, Paily KP and Manonmani AM, Mosquito adulticidal activity of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis subsp. subtilis*. *Pest Manag Sci* 68:1447–1450 (2012).
- 18 Assié LK *et al.*, Insecticide activity of surfactins and iturins from a biopesticide *Bacillus subtilis* Cohn (S499 strain). *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet* 67:647–655 (2002).
- 19 Yun DC, Yang SY, Kim YC, Kim IS and Kim YH, Identification of surfactin as an aphicidal metabolite produced by *Bacillus amyloliquefaciens* G1. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 56:751–753 (2013).
- 20 Yang SY, Lim DJ, Noh MY, Kim JC, Kim YC and Kim IS, Characterization of biosurfactants as insecticidal metabolites produced by *Bacillus subtilis* Y9. *Entomol Res* 47:55–59 (2017).
- 21 Haynes KF, Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. *Annu Rev Entomol* 33:149–168 (1988).
- 22 Chalfant RB, Todd JW, Kent Taylor W and Mullinix B, Laboratory studies on the antifeeding effect of a fungicide, guazatine, on eleven species of phytophagous insects. *J Econ Entomol* 70:513–517 (1977).

- 23 Blaney WM, Simmonds MSJ, Ley SV, Anderson JC and Toogood PL, Antifeedant effects of azadirachtin and structurally related compounds on lepidopterous larvae. *Entomol Exp Appl* 55:149–160 (1990).
- 24 Wright DJ and Verkerk RHJ, Integration of chemical and biological control systems for arthropods: evaluation in a multitrophic context. *Pestic Sci* 44:207–218 (1995).
- 25 Desneux N, Decourtye A and Delpuech J-M, The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu Rev Entomol* 52:81–106 (2007).
- 26 Biondi A, Mommaerts V, Smagghe G, Viñuela E, Zappalà L and Desneux N, The non-target impact of spinosyns on beneficial arthropods. *Pest Manag Sci* 68:1523–1536 (2012).
- 27 Cutler GC, Insects, insecticides and hormesis: evidence and considerations for study. *Dose Response* 11:154–177 (2012).
- 28 Franca S, Breda M, Barbosa D, Araujo A and Guedes C, The Sublethal Effects of Insecticides in Insects, in *Biological Control of Pest and Vector Insects*, ed. by Shields VDC. IntechOpen, London (2017). <https://doi.org/10.5772/66461>.
- 29 Schlinger EI and Mackauer MJP, Identity, distribution, and hosts of *Aphidius matricariae* Haliday, an important parasite of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Hymenoptera: Aphidiidae — Homoptera: Aphidoidea). *Ann Entomol Soc Am* 56:648–653 (1963).
- 30 Coutte F, Leclère V, Béchet M, Guez JS, Lecouturier D, Chollet-Imbert M *et al.*, Effect of pps disruption and constitutive expression of *srfA* on surfactin productivity, spreading and antagonistic properties of *Bacillus subtilis* 168 derivatives. *J Appl Microbiol* 109:480–491 (2010).
- 31 Coutte F, Lecouturier D, Ait Yahia S, Leclère V, Béchet M, Jacques P *et al.*, Production of surfactin and fengycin by *Bacillus subtilis* in a bubbleless membrane bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 87: 499–507 (2010).
- 32 Mejri S, Siah A, Coutte F, Magnin-Robert M, Randoux B, Tisserant B *et al.*, Biocontrol of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* using cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Environ Sci Pollut Res Int* 1–12: 29822–29833 (2017). <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9241-9>.
- 33 Chesnais Q, Caballero Vidal G, Coquelle R, Yvon M, Mauck K, Brault V *et al.*, Post-acquisition effects of viruses on vector behavior are important components of manipulation strategies. *Oecologia* 194: 429–440 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00442-020-04763-0>.
- 34 Tjallingii WF, Electrical nature of recorded signals during stylet penetration by aphids. *Entomol Exp Appl* 38:177–186 (1985).
- 35 Giordanengo P, EPG-Calc: a PHP-based script to calculate electrical penetration graph (EPG) parameters. *Arthropod-Plant Interact* 8: 163–169 (2014).
- 36 Tjallingii WF and Esch TH, Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals. *Physiol Entomol* 18:317–328 (1993).
- 37 Chesnais Q, Ameline A, Géraldine D, Vincent LR and Couty A, Aphid parasitoid mothers don't always know best through the whole host selection process. *PLoS ONE* 10:e0135661 (2015).
- 38 Rehman A and Powell W, Host selection behaviour of aphid parasitoids (Aphidiidae: Hymenoptera). *J Plant Breed Crop Sci* 2:299–311 (2010).

- 39 Kim SK, Kim YC, Lee S, Kim JC, Yun MY and Kim IS, Insecticidal activity of rhamnolipid isolated from *Pseudomonas sp.* EP-3 against green peach aphid (*Myzus persicae*). *J Agric Food Chem* 59:934–938 (2011).
- 40 Jang JY, Yang SY, Kim YC, Lee CW, Park MS, Kim JC *et al.*, Identification of orfamide A as an insecticidal metabolite produced by *pseudomonas protegens* F6. *J Agric Food Chem* 61:6786–6791 (2013).
- 41 Drewes CD, Zoran MJ and Callahan CA, Sublethal neurotoxic effects of the fungicide benomyl on earthworms (*Eisenia fetida*). *Pestic Sci* 19: 197–208 (1987).
- 42 Nielsen BS, Larsen EH, Ladefoged O and Lam HR, Neurotoxic effect of maneb in rats as studied by neurochemical and immunohistochemical parameters. *Environ Toxicol Pharmacol* 21:268–275 (2006).
- 43 LePage KT, Goeger D, Yokokawa F, Asano T, Shioiri T, Gerwick WH *et al.*, The neurotoxic lipopeptide kalkitoxin interacts with voltage-sensitive sodium channels in cerebellar granule neurons. *Toxicol Lett* 158:133–139 (2005).
- 44 Velkov T, Dai C, Ciccotosto GD, Cappai R, Hoyer D and Li J, Polymyxins for CNS infections: pharmacology and neurotoxicity. *Pharmacol Ther* 181:85–90 (2018).
- 45 Park SY, Kim J-H, Lee SJ and Kim Y, Surfactin exhibits neuroprotective effects by inhibiting amyloid β -mediated microglial activation. *Neurotoxicology* 38:115–123 (2013).
- 46 Irwin M, Kampmeier G and Weisser W, Aphid movement: process and consequences, in *Aphids as Crop Pests*, ed. by van Emden H and Harrington R. CAB International, Wallingford, UK, pp. 153–186 (2007). <https://doi.org/10.1079/9780851998190.0153>.
- 47 Powell G, Tosh CR and Hardie J, Host plant selection by aphids: behavioral, evolutionary, and applied perspectives. *Annu Rev Entomol* 51: 309–330 (2006).
- 48 Ameline A, Couty A, Martoub M, Sourice S and Giordanengo P, Modification of *Macrosiphum euphorbiae* colonisation behaviour and reproduction on potato plants treated by mineral oil. *Entomol Exp Appl* 135:77–84 (2010).
- 49 Umoru PA and Powell W, Sub-lethal effects of the insecticides pirimicarb and dimethoate on the aphid parasitoid *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Braconidae) when attacking and developing in insecticide-resistant hosts. *Biocontrol Sci Technol* 12:605–614 (2002).
- 50 Irving BSN and Wyatt IJ, Effects of sublethal doses of pesticides on the oviposition behaviour of *Encarsia formosa*. *Ann Appl Biol* 75:57–62 (1973).
- 51 De Zutter N, Audenaert K, Ameye M, Haesaert G and Smagghe G, Effect of the mycotoxin deoxynivalenol on grain aphid *Sitobion avenae* and its parasitic wasp *Aphidius ervi* through food chain contamination. *Arthropod-Plant Interact* 10:323–329 (2016).
- 52 Godfray HCJ and Godfray HCJ, *Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology*. Princeton University Press, Princeton, NJ (1994).
- 53 Morehead SA and Feener DH, Visual and chemical cues used in host location and acceptance by a dipteran parasitoid. *J Insect Behav* 13:613–625 (2000).
- 54 Richerson JV and Deloach CJ, Some aspects of host selection by *Perilitus coccinellae*. *Ann Entomol Soc Am* 65:6–839 (1972).
- 55 Nakamatsu Y and Tanaka T, How does the ectoparasitoid wasp *Euplectrus separatae* (Hymenoptera: Eulophidae) recognize a suitable oviposition site on the host larva *Pseudaletia separate* (Lepidoptera: Noctuidae)? *Appl Entomol Zool* 40:185–191 (2005).

56 Yamamoto M, Chau NNB and Maeto K, Host movement initiates oviposition behavior of *Meteorus pulchricornis*, a braconid parasitoid of free-living lepidopteran larvae. Appl Entomol Zool 44:53–59 (2009).

Chapitre 5. Perturbations comportementales à travers la résistance des plantes et conséquences sur les interactions multitrophiques

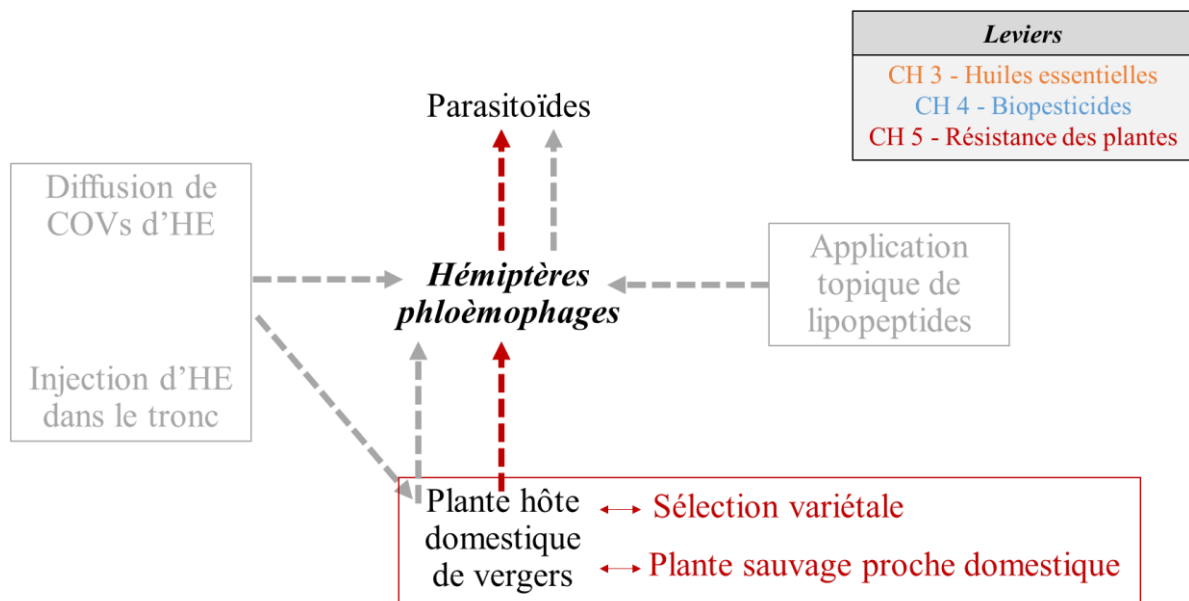


Figure 17 : Leviers basés sur la résistance de la plante

Présentation de l'étude et principaux résultats :

Le pommier est l'hôte de diverses espèces d'insectes phytophages, qui exploitent différentes niches trophiques au sein de la plante (Stöckli, 2008). Certaines espèces consomment les fruits, comme les larves de Lépidoptères tels que le carpocapse du pommier *Cydia pomonella* (Tortricidae) L. ou les larves de l'hoplocampe du pommier *Hoplocampa testudinea* (Tenthredinidae) Klug. Les larves de l'anthonome du pommier *Anthonomus pomorum* (Coleoptera: Curculionidae) consomment quant à elles les bourgeons floraux. Enfin dans le cas des pucerons, certaines espèces telles que *D. plantaginea*, le puceron des galles rouges *D. devecta* ou encore *A. pomi* se développent sur les feuilles des pommiers, et consomment la sève phloémienne. Les colonies de *E. lanigerum* se trouvent sur le tronc sur lequel ils se nourrissent des galles qu'ils induisent et qui consistent en une hypertrophie cellulaire et une hyperplasie qui remplace les tissus du xylème (Brown *et al.*, 1991).

Pour lutter contre ces différents ravageurs, certaines études se sont orientées vers la recherche de résistance variétale au niveau du pommier domestique. Certaines d'entre elles consistent en un suivi des taux d'infestation et des dégâts des ravageurs dans un « gradient » de conditions contrôlées, du laboratoire au verger en passant par les serres. Pour *D. plantaginea*, par exemple, des suivis des taux d'infestation des pommiers (Arnaoudov & Kutinkova, 2006), de l'abondance des pucerons et des niveaux de dégâts sur la plante (Miñarro & Dapena, 2008; Razmjou *et al.*, 2014) en serre et en vergers ou des suivis de la durée de développement, de la longévité et de la fécondité des pucerons en laboratoire (Angeli & Simoni, 2006) permettent d'appréhender la résistance des différents cultivars de pommiers. Ainsi, sur la base des études précédemment citées, les variétés Gala et Golden sont considérées comme sensibles à *D. plantaginea*, tandis que des variétés comme Florina, GoldRush et Galarina y sont résistantes. Des résistances contrastées entre cultivars ont aussi été observées pour d'autres ravageurs du pommier, comme l'hoplocampe du pommier *H. testudinae* (Vincent *et al.*, 2019; Blatt & Hiltz, 2021), ou vis-à-vis du carpocapse *C. pomonella* pour lequel Joshi *et al.* (2015) ont développé un index de sensibilité des pommiers en étudiant sa préférence d'oviposition sur 10 variétés sur plusieurs années. Quelques études ont également été publiées sur le taux d'infestation et la résistance de différents cultivars de *M. domestica* à l'anthonome du pommier *A. pomorum* (Kalinová *et al.*, 2000; Mody *et al.*, 2015, 2011).

Afin d'expliquer ces différences de résistance/sensibilité entre cultivars, des études ont cherché à identifier des composés chimiques impliqués dans l'interaction pommier-ravageur. Par exemple, certains composés comme les COV émis par les pommiers sont détectés par les ravageurs avant le contact avec la plante. Ces COV jouent un rôle important dans la localisation des pommiers pour le carpocapse de la pomme *C. pomonella* (Piskorski & Dorn, 2010). Vallat & Dorn (2005) ont montré qu'il existait des changements saisonniers dans les émissions de COV des pommiers et, en conséquence, des réponses associées des carpocapses femelles adultes. L'analyse des COV indique que le benzaldéhyde et l'acétate de butyle pourraient contribuer à l'effet répulsif observé à certaines saisons, et bien que l'identité des composants

attractifs à la mi-saison reste à élucider, ceux-ci proviennent clairement du fruit et non du rameau avec ses feuilles. L'anthonome du pommier utilise aussi les COV émis par les pommiers pour localiser son hôte, le linalool semblant être responsable de l'attractivité des pommiers (Henneberg *et al.*, 2022). Les COV impliqués dans la localisation des pommiers par les femelles ailées de *D. plantaginea* (lors de la migration en automne du plantain vers le pommier) ne sont pas connus. Cependant, van Tol *et al.* (2009) ont montré que l'infestation des pommiers par les femelles induisait une libération accrue de quatre esters (butyrate d'hexyle, butyrate de (E)-2-hexényle, 3-méthylbutyrate de (Z)-3-hexényle et 2-méthylbutyrate d'hexyle) qui augmentait le nombre d'individus *D. plantaginea* mâles et diminuait le nombre d'autres espèces de pucerons capturés dans des pièges placés au niveau de la canopée des arbres. Ces esters n'étaient cependant pas attractifs pour les mâles de *D. plantaginea* sans la phéromone sexuelle des femelles. Une fois les ravageurs en contact avec la plante, les composés à la surface de la feuille sont les prochains médiateurs chimiques auxquels ils sont exposés. Les glucides solubles, tels que le glucose, le fructose et le saccharose, et des polyalcools, tels que le sorbitol, le québrachitol et le myo-inositol, influencent positivement la ponte de *C. pomonella* sur la face inférieure des feuilles des pommiers (Lombarkia & Derridj, 2008). Concernant les éléments en lien avec la chimie interne de *M. domestica*, l'essentiel des études portent sur la composition des fruits du fait de l'importance économique de la production de pommes (Pires *et al.*, 2018; Veberic *et al.*, 2005). Des études ont porté sur la composition de l'huile essentielle de feuille de pommier (Walia *et al.*, 2012) ou sur les composés phénoliques présents dans les feuilles (Liaudanskas *et al.*, 2014), ainsi que sur la composition de la sève phloémienne notamment en terme de sucres et d'acides organiques (Görg *et al.*, 2021). Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a fait de lien entre ces composés et la sensibilité des pommiers aux ravageurs.

La lutte contre les ravageurs peut s'envisager de manière combinatoire via une régulation bottom-up à partir de plantes résistantes et via une régulation top-down par la lutte biologique. En vergers, la régulation naturelle de *D. plantaginea* est effectuée par des prédateurs généralistes tels que des syrphes, des coccinelles et des pincés-oreilles, et des parasitoïdes, appartenant essentiellement au genre *Ephedrus sp.* (Braconidae) (Dib *et al.*, 2010). Dans le contrôle top-down de *D. plantaginea* par lâchers d'ennemis naturels, les parasitoïdes sont souvent préférés aux prédateurs du fait de leur spécialisation à quelques espèces ou quelques genres taxonomiques d'hôtes, ce qui limite leurs effets potentiels sur des organismes non-cibles (Emden & Harrington, 2007). Des études ont été conduites afin d'optimiser les lâchers de parasitoïdes pour réguler *D. plantaginea* (Ferrais *et al.*, 2021), mais l'effet bottom-up des variétés de pommiers sur les parasitoïdes via les pucerons n'a pas été testé. De telles études ont été réalisées pour d'autres systèmes tritrophiques (par exemple, Cai *et al.*, 2009; Kaplan *et al.*, 2016; Weber *et al.*, 2020), et révèlent des effets contrastés de la résistance des variétés sur les parasitoïdes qui peuvent affecter le succès de la régulation des pucerons. Ainsi, la variabilité intraspécifique de *M. domestica*, appréhendée au travers de cultivars ayant différents niveaux de sensibilité/résistance, aura probablement un effet sur la performance des parasitoïdes via l'altération de la qualité de leurs pucerons hôtes. La qualité de l'hôte pour la croissance et le

développement des parasitoïdes est souvent associée à la taille de l'hôte (Rehman & Powell, 2010) ou son taux de lipides (Le Lann *et al.*, 2012). Jusqu'ici les études portant sur les effets bottom-up des variétés sur les parasitoïdes via les pucerons n'ont jamais étudié le comportement alimentaire de ces derniers. Cependant, les effets des variétés sur le comportement alimentaire des pucerons peuvent grandement impacter les paramètres de la performance des pucerons déterminant sa qualité en tant qu'hôte pour les parasitoïdes.

La problématique de la première étude était donc la suivante : dans quelle mesure le comportement alimentaire de *D. plantaginea* peut-il être un élément explicatif des effets bottom-up du pommier sur les parasitoïdes ? Le parasitoïde *E. cerasicola* a été utilisé dans cette étude : en effet, cette espèce est connue pour parasiter et se développer avec succès dans *D. plantaginea* (Hullé *et al.*, 2020). La résistance de trois cultivars du pommier domestique (Gala, Ariane et Greensleeves) a été évaluée au regard du comportement alimentaire des pucerons, de leur durée de développement et de leur masse et contenu en lipides et en eau. Ces trois derniers paramètres définissent en partie la qualité des pucerons en tant qu'hôte pour les parasitoïdes. Les cultivars de pommiers pourraient donc avoir un effet bottom-up sur les parasitoïdes en affectant la performance et l'accumulation de ressource chez les pucerons. Pour tester l'existence d'un tel effet bottom-up nous avons mesuré le sex-ratio, la durée de développement et la taille des tibias des parasitoïdes s'étant développés dans des pucerons soumis aux différents cultivars de pommiers, ainsi que la charge en œufs pour les femelles. Aucune différence de durée de développement n'a été mise en évidence chez les pucerons, bien que les larves élevées sur Greensleeves avaient une masse plus faible et un taux de lipides plus important que celles élevées sur les deux autres cultivars. Sur Ariane et Greensleeves, la prise de sève phloémienne a été réduite, que ce soit en termes de proportion de pucerons réalisant cette phase, ou de durée totale de la phase. La seule répercussion observée sur les parasitoïdes a été un allongement de leur durée de développement sur ces deux cultivars sur lesquels les pucerons ont présenté des difficultés pour s'alimenter. La plante peut donc bien impacter le troisième niveau trophique via la quantité et la qualité des ressources nutritives acquises par les pucerons.

Au niveau interspécifique, les espèces sauvages apparentées aux plantes cultivées (« Crop Wild Relatives » CWR en anglais), qui comprennent les espèces ayant participé à la domestication des cultures ainsi que d'autres espèces qui leur sont plus ou moins proches phylogénétiquement, constituent un vaste réservoir de ressources génétiques potentiellement utiles pour l'amélioration variétale (Hodgkin & Hajjar, 2007). Ces CWR peuvent être des sources potentielles de gènes de résistance ; en effet, bien que les mécanismes évolutifs liés à la domestication des cultures soient complexes, il est généralement considéré que les plantes sauvages sont plus résistantes que les cultures, dans la mesure où ces dernières ont été sélectionnées sur des critères de productivité au détriment de leur résistance aux stress biotiques (trade-off entre rendement et résistance) (Whitehead *et al.*, 2016). Cependant à notre connaissance, pour ce qui est des ravageurs, les seules études qui ont été conduites se sont penchées sur la résistance de *M. sylvestris* vis-à-vis de l'anthonome du pommier *A. pomorum* (Knuff *et al.*, 2017; Henneberg *et al.*, 2022). Enfin, à l'échelle de l'Europe des flux de gènes

des pommiers domestiques aux pommiers sauvages européens, appelés introgression, sont des phénomènes courants qui sont susceptibles de modifier la résistance de *M. sylvestris* aux ravageurs dans la mesure où les espèces domestiques sont supposées plus sensibles que leur homologue sauvage.

Ainsi dans la seconde étude, nous avons étudié le comportement alimentaire de *D. plantaginea* et ses traits d'histoire de vie sur le pommier sauvage européen *M. sylvestris*, en prenant en compte la structure génétique des populations de ce CWR du pommier domestique. Comme cela a été souligné, très peu d'études évaluent la résistance des pommiers sauvages aux ravageurs, et dans la mesure où la proximité génétique des populations peut être corrélée avec les niveaux de résistance aux agents pathogènes chez le pommier sauvage *Malus sieversii* (Rosaceae) (Ledeb.) M. Roem. (Richards *et al.*, 2009; Harshman *et al.*, 2017), la structure génétique des populations de *M. sylvestris* pourrait être liée à la résistance à *D. plantaginea*. Chez les espèces sauvages de pommiers, la variabilité intraspécifique peut être liée à l'adaptation à des conditions environnementales spécifiques ou à des parasites locaux sur l'aire de distribution de l'espèce. Ainsi, dans cette seconde étude, nous avons émis l'hypothèse qu'il existe un lien entre la structure génétique du pommier sauvage européen *M. sylvestris* et le comportement alimentaire et les traits d'histoire de vie du puceron *D. plantaginea*. Trois populations de *M. sylvestris* (danoise, française et roumaine) et *M. domestica*, en tant que référence sensible à *D. plantaginea*, ont été testées. Le comportement alimentaire des pucerons ainsi que leur fécondité, leur masse et leur survie ont été étudiés. Les pommiers sauvages danois et français étaient les plus proches génétiquement, et la population de pommier sauvage européen la plus proche génétiquement de *M. domestica* était la population roumaine. Nos résultats ont montré que les pucerons soumis à des pommiers proches génétiquement présentaient le même comportement alimentaire. Un phénomène d'antixénose a été observé chez les pucerons sur la population danoise de pommiers sauvages, ce qui a entraîné une réduction de la masse des pucerons soumis à cet hôte ; aucun autre effet sur la performance des pucerons n'a été observé. En ce qui concerne l'effet de l'introgression du génome de *M. domestica* dans le génome de *M. sylvestris* sur le comportement alimentaire et la performance des pucerons, étonnamment les pucerons soumis à des pommiers hybrides *M. sylvestris* – *M. domestica* ont eu une durée d'ingestion de sève phloémienne et une masse réduites comparés aux pucerons soumis à des pommiers *M. sylvestris* purs, ce qui suggère que l'introgression améliorerait la résistance des pommiers sauvages vis-à-vis de *D. plantaginea*.

Article n°5 – non soumis

Bottom-up effects of apple cultivars with contrasting resistance on parasitoids via aphid hosts

Author: Thomas Denoirjean^{1*}, Charlotte Engels^{1*}, Guillaume Jean Le Goff², Françoise Dubois¹, Kevin Tougeron¹, Géraldine Doury¹, Arnaud Ameline¹, Aude Couty¹

¹ UMR CNRS 7058 EDYSAN (Écologie et Dynamique des Systèmes Anthropisés), Université de Picardie Jules Verne, 33 rue St Leu, 80039 Amiens Cedex, France.

² Earth and Life Institute, Biodiversity Research Centre, UC Louvain – Croix du sud 9 4–5 boîte L7.07.04, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgique.

Corresponding author: arnaud.ameline@u-picardie.fr

* These authors contributed equally to this work.

Abstract

Intraspecific variability in the quality of plants as hosts for phytophagous insects may have consequences for the structure of associated food webs. Host plants can impact various life history traits of aphids and thus modify the nutritional resources they represent for the higher trophic level, especially parasitoids which have only one host and obtain all their resources from it. In the context of a bottom-up effect, the quantity and quality of nutritional resources contained in aphids could then impact the performance of parasitoids developing in aphids reared on resistant plant varieties. We aimed to determine the bottom-up effects of intraspecific variability in different cultivars of the domestic apple tree (*Malus domestica*) on the performance of the rosy apple aphid (*Dysaphis plantaginea*) and its parasitoid *Ephedrus cerasicola*. The performance of the parasitoids was studied by measuring the size of their tibia, their developmental duration and the egg load of females according to the cultivar on which the host aphids had been reared. Only the development time of the parasitoids was found to be longer on two of the three cultivars used in our study. In order to explain the modification of the parasitoids performances, we measured some aphids life history traits such as their pre-reproductive period, their lipid and water resources as well as their feeding behavior by the electropetrography technique, in particular the phases related to phloem sap ingestion. On cultivars on which the development time of parasitoids was reduced, aphids feeding behavior variables related to phloem were negatively impacted. These results are discussed in order to evaluate how intraspecific plant diversity can influence crop auxiliaries via pests.

Key words

Bottom-up effects, trophic interactions, intraspecific diversity, *Dysaphis plantaginea*, parasitoid

1. Introduction

Intraspecific variability in the quality of plants as hosts for phytophagous insects may have complex consequences for the structure and dynamics of associated food webs (Wimp *et al.* 2005; Underwood 2009; Barbour *et al.* 2016). These differences in quality between plant individuals could modulate the distribution, abundance, and performance of phytophagous insects and their natural enemies (Moon *et al.* 2000; Ode 2006; Kaiser *et al.* 2017). In a context of crop domestication, the process of artificially selecting plants to increase their productivity has usually been accompanied by an increase of their vulnerability to biotic and abiotic stresses compared to their wild ancestor (Macfadyen & Bohan 2010). One cultivated plant species, through a range of cultivars selected for their resistance against phytophagous insects, can therefore present intraspecific variability in morphological traits, nutrient contents, and the concentration of secondary compounds (O'Reilly-Wapstra *et al.* 2007; War *et al.* 2012; López-Goldar *et al.* 2018). As the quality of host plants can influence various life history traits of phytophagous insects feeding on them, it can consequently influence the quantity and quality of resources available to the upper trophic level (Kaplan *et al.* 2016). Phytophagous insects represent a food source for both predators and parasitoids. However, unlike predators that can feed on several individual preys, parasitoids have only one host and obtain all their resources from it (Rivero & West 2005; Harvey & Gols 2018). In a context of bottom-up effects, the quality and quantity of resources contained in phytophagous insects could therefore influence the performance of parasitoids when they develop in phytophagous insects reared on cultivars with variable levels of resistance (Agrawal 2000; Karimzadeh & Wright 2008). Although several studies have highlighted the cascading effects of host plants on natural enemies of phytophagous insects through changes in host quality (Stiling & Moon 2005; Gols *et al.* 2008; Stoepler *et al.* 2011) and chemical cues (Turlings *et al.* 1990; Thaler *et al.* 2002; Wu & Baldwin 2009), there are still few studies on how genotypic variability in plants can affect the performance of parasitoids. Moreover, these physiological and chemical studies are rarely coupled with the study of the feeding behavior of the phytophagous insect which can be a major explanatory element (Rapusas & Heinrichs 1990; Zehnder *et al.* 2001; Harvey & Strand 2002).

We aimed to determine the bottom-up effects of different cultivars of the domestic apple (*Malus domestica*) on the performance of *Ephedrus cerasicola*, a commercially available parasitoid of the rosy apple aphid (*Dysaphis plantaginea*). Our study raised the following questions: (1) Can intraspecific plant diversity affect the aphid resource for the parasitoid? (2) if so, can the qualitative and quantitative differences in the aphid resource for the parasitoid explain the

observed physiological differences in the parasitoid? (3) Can differences in aphid performance and feeding behavior explain the physiological and chemical differences observed at the third trophic level?

To answer these questions, we selected three domestic apple cultivars exhibiting different degrees of resistance towards *D. plantaginea* which is one of its major pests (Blackman & Eastop 1984). The performance of the parasitoids *E. cerasicola* was investigated through the measure of their size, development time, and the egg load of females according to the cultivar on which their aphid host had been reared as well as the sex ratio. In order to provide explanatory elements, the size, the development time and the resources contained in *D. plantaginea* (lipid and water contents) were studied as well as its feeding behavior using the electropenetrography technique.

2. Materials and methods

2.1. Plants and insects

Three cultivars of the domestic apple *Malus domestica* tree were used for the experiments. Gala is a cultivar considered as sensitive to aphids (Miñarro & Dapena 2007), whereas Ariane and Green Sleeves are potentially resistant to aphids (Chevreau *et al.* 1998; Laurens *et al.* 2005). The three cultivars used were supplied as vitroplants by Végépolys Valley (Angers, France), their height was around 4 cm and they had 6 ± 2 leaves. Upon reception, all cultivars were grown in plastic pots (60 x 60 x 70 cm) with commercial sterilized potting soil (Botanic, reference: 386895, 86.50 g per pot) and maintained in a growth chamber under controlled conditions (temperature $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 16:8 h L:D photoperiod, $60 \pm 5\%$ relative humidity (RH) and 35 PPFD). For all the experiments, plants were used at a comparable phenological stage with six to nine fully-developed leaves per plant and a height of 6 to 8 cm (13 ± 2 weeks after potting).

The rosy apple aphids were provided by INRAE and originated from a colony captured in spring 2018 in an orchard of Agrocampus ouest in Angers (France) (Philippe Robert, personal communication). The aphid population was mass reared on the Jonagold cultivar and maintained in a climate-controlled room (same conditions as above) to maintain parthenogenesis. The Jonagold cultivar was supplied by CRA-W (Gembloux, Belgium) and obtained by in-vitro multiplication (Druat 1997). Synchronized aphid nymphs were obtained by isolating adult females on a leaf on the host plant for 24 hours in an aerated plastic box (36 x 24 x 14 cm) to allow them to produce nymphs. The adults were then removed from the host plant and the nymphs left to develop on it until they were used in the experiments.

For this study we used the generalist endoparasitoid wasp *Ephedrus cerasicola*, a commercially available parasitoid of the rosy apple aphid. Individuals were obtained as mummies from Viridaxis (Charleroi, Belgium). Upon reception, mummies were placed individually in plastic tubes (75 x 13 mm) closed with a cotton plug in a climate chamber at $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ and 16:8 h L:D photoperiod pending their emergence and use for the experiments.

2.2. Feeding behavior of aphids / EPG recording

The feeding behavior of aphids was studied using the electropetrography (EPG) technique (Tjallingii 1988) by comparing the feeding behavior of aphids placed on plants of the three apple cultivars.

Recordings were carried out on 10-day-old aphids, each one being connected to an electrode consisting of a 20- μm diameter, 2-cm long gold wire glued to a 2-cm long copper wire soldered to the head of a 2.2-mm diameter brass nail used to track the electrical signals of the aphid in the apple leaf. Aphids were connected by the dorsal part of their abdomen to the gold wire of the electrode via a drop of conductive water-based silver glue (EPG systems, Wageningen, the Netherlands). Eight aphids were individually placed on the abaxial part of a fully expanded leaf of eight individual plant to feed. Their behavior was recorded for 8 hours each during the photophase by the Giga-8 DC-EPG amplifier inside a Faraday cage in a room under controlled conditions ($20 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 5\%$ RH, 35 PPFD and a 16:8 h L:D photoperiod).

Acquisition and analysis of the EPG waveform were carried out using the EPG Style+ software (EPG Systems, <http://www.epgsystems.eu>). Different EPG parameters were determined from the waveforms of the EPG data and they were calculated using the EPG-Calc 6.1.7 software (Giordanengo 2014). The waveform "Pr" corresponded to the probing behavior in the plant tissue (parameters studied: number of probing (n_{Pr}), number of brief probes $<3\text{min}$ (N_{bPr}), total duration of probing (s_{Pr}) and time before the first probe ($t > 1\text{Pr}$)). Waveform "C" corresponded to stylet pathways in intracellular apoplastic plant tissues (parameters studied: number of pathway phase (n_{C}), total duration of pathway phase (s_{C})). Waveform "E1" represented salivation within phloem vessels (parameter studied: number of salivation phase (s_{E1}) and total duration of salivation (s_{E1})). Waveform "E2" represented passive phloem sap ingestion (parameters studied: number of phloem sap ingestion (n_{E2}) and total duration of phloem sap ingestion (s_{E2})). Waveform "G" corresponded to active xylem sap ingestion (parameters studied: number of xylem sap ingestion (n_{G}), total duration of xylem sap ingestion (s_{G})). Lastly, waveform "F" corresponded to derailment of the stylets (parameters studied: number of stylets derailment (n_{F}), total duration of stylets derailment (s_{F})). The number of aphids and plants used to evaluate the probing behavior were: 27 aphids on 13 Gala cultivar plants, 26 aphids on 14 Ariane cultivar plants and 31 aphids on 15 Green Sleeves cultivar plants.

2.3. Aphid life history traits

Pre-reproductive period, mass, lipid and water contents were measured on aphids using a clip-cage system, composed of a plier supporting an acrylic transparent 235 cylinder (\emptyset 1.5cm, 0.8cm long) closed by a nylon gauze while the airtightness on the leaf was ensured using felt. To determine aphid pre-reproductive period (duration in days from the day they were larviposited to the day they first laid a nymph), three to four synchronized neonate aphids were isolated in a clip-cage placed on the abaxial part of a leaf of the plant on which they had been larviposited. Four to five clip-cages were placed per plant on the most expanded leaves. Plants were then individually placed in an aerated plastic box (36 x 24 x 14 cm). Observations were done every 24 hours until the day of the first larviposition by aphid adults. The numbers of aphids and plants used to evaluate the pre-reproductive period were: 21 aphids on 7 Gala cultivar plants, 18 aphids on 7 Ariane cultivar plants and 23 aphids on 10 Green Sleeves cultivar plants.

Quantification of the lipid content of four-day old nymphs and 10-day old young adult aphids was performed as described by Pirotte *et al.* (2018). Aphids were freeze-dried at -20°C in 0.5 ml Eppendorf vials. They were then weighed individually to the nearest 0.01 mg to obtain their fresh mass using a Mettler-electrobalance Me22, Mettler-Toledo (Zaventem, Belgium). Then, they were dried for 3 days at 60°C to obtain their individual dry mass. A total of 60 nymphs and 60 adult aphids were weighed per cultivar. For lipid extraction, each aphid weighed beforehand was individually placed into an Eppendorf tube containing 1ml of chloroform/methanol (2:1 v/v) solution and agitated for 2 weeks. After that, aphids were dried at 60°C for 12h to remove the remains of the solution. The individual fat mass (μg) was expressed as the difference in mass before and after lipid extraction. The individual fat content (%) was calculated as the fat mass divided by the dry mass. The individual water content (%) was calculated as the water mass divided by the fresh mass.

The number of replicates for nymphs was 49 nymphs on 6 Gala cultivar plants, 50 nymphs on 8 Ariane cultivar plants and 41 nymphs on 5 Green Sleeves cultivar plants. For adults the results were obtained from 59 adults on 6 Gala cultivar plants, 56 adults on 7 Ariane cultivar plants and 59 adults on 7 Green Sleeves cultivar plants.

2.4. Parasitoid life history traits

The life history traits measured for parasitoids were their developmental time, the sex ratio of emerging individuals, the length of their hind leg tibia and the egg load of females. These parameters were used as proxies to evaluate their fitness.

Upon emergence, parasitoids were sexed and mating was allowed for 48 hours by grouping three females and two males in a 15 mL plastic tube (120 x 35 mm) with a drop of 1:3 water/honey solution under the cap to feed and hydrate them. Two to three-day-old parasitoids (three females and two males) were released into an insect-proof nylon mesh box (30 x 30 x 30

cm) containing one apple host-plant on which 25 to 40 four-day-old aphid nymphs had been placed in a controlled room ($20 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 5\%$ RH, 35 PPF and a 16:8 h L:D photoperiod). A cotton soaked in diluted honey was placed inside the box to provide food for the parasitoids. After 36 hours the parasitoids were removed from the box to avoid any superparasitism (i.e., multiple parasitism on single hosts). When parasitized aphids had formed sufficiently developed mummies (dark brown color and rigid cuticle), they were carefully removed from the host plant and individually placed in a plastic tube (75 x 13 mm) until parasitoid emergence. The development time (in days) was determined as the time between the day parasitoid parents were inserted in the cage and the day their offspring emerged. Emergences were checked every day at the same time. Parasitoids were sexed at emergence. In total 9 Gala, 9 Ariane and 9 Green Sleeves cultivar plants were used to rear parasitoid individuals (males and females) of which several life history traits were measured. To calculate the mean development time, 182 parasitoids developed in aphids reared on the Gala cultivar were used, 114 for the Ariane cultivar and 123 for the Green Sleeves cultivar. Sex ratio was calculated on a total of 189 adult parasitoids for Gala cultivars, 120 for Ariane cultivars and 124 for Green Sleeves cultivars.

On the day of emergence, male parasitoids were individually stored in a freezer at -80°C . Emerged females were placed individually in a plastic tube (75 x 13 mm) for 48h in the controlled room at 20°C with a cotton ball soaked in the water/honey mixture to feed them, in order to let them develop their egg stock before they were placed individually in a freezer at -80°C . Tibias of male and female individuals were photographed under a Leica M205C stereo microscope and measured using a software Leica application suite (Tougeron *et al.* 2020). Female egg load was determined under the same stereo microscope. Females were placed in a drop of PBS (0.1%), their ovaries dissected and the number of mature eggs recorded (Le Lann *et al.* 2012). The size of the tibia was measured on 42 parasitoid individuals reared on the Gala cultivar, 37 on the Ariane cultivar and 50 on the Green Sleeves cultivar. The egg load was determined on 21 parasitoid individuals reared on the Gala cultivar, 17 on the Ariane cultivar and 29 on the Green Sleeves cultivar.

2.5. Statistical analysis

All data analysis was performed using the R studio software version 4.1.2 (R, Core Team, 2022).

To study the effect of apple cultivar on aphid nymphs and adults life history traits (fresh mass, fat mass, fat content, water content), a GLMM using a Gaussian distribution was performed. The apple cultivar was included as the main factor and the identity of each tree was used in the models as a random effect. The effect of the aphid cultivar on aphids pre-reproductive period has been carried out using the Cox proportional hazards (CPH) regression model, which is suitable to treat time-dependent parameters. The assumption of validity of proportional hazards

was validated using the function “coxph” (package R: “survival”, version 3.1.8: <https://github.com/therneau/survival>) (Therneau & Grambsch 2000).

For the effect of apple cultivar on aphid feeding behavior, a GLM without random effects was used as less pseudoreplications were performed compared to the life history traits experiments. Data on EPG parameters describing the number of occurrences of a particular phase (e.g. “n_E2”) were not normally distributed (count data). Accordingly, a GLM was carried out using a Poisson distribution (link = “log”). EPG data on feeding phase durations (e.g. duration of phloem sap ingestion “s_E2”) were not normally distributed, so a GLM using a Gamma (link = “inverse”) distribution was carried out. Data analysis on EPG parameters describing time before the first probe (“t.1Pr”) and before the first phloem sap ingestion (“t.1E2”) has been carried out using the Cox proportional hazards (CPH) regression model. Absence of an EPG reading was treated as a missing value. The proportion of aphids performing each EPG parameter was tested using a Chi-square test of homogeneity.

To test the bottom-up effect of the cultivar on the parasitoids, GLMMs were performed. The measurement of individuals that had developed in aphids reared on the same individual plant led to use the identity of each tree as a random effect. The size of the parasitoid tibiae was normally distributed, therefore a GLMM using a Gaussian distribution was used. For data on female parasitoids eggs load, a GLMM using a Poisson distribution was used. Parasitoid sex ratio was analyzed by a GLMM using a binomial distribution and analysis of parasitoid development time has been carried out using the Cox proportional hazards (CPH) regression model.

Likelihood ratio and Chi-square post-hoc comparison tests were carried out by pairwise comparisons using estimated marginal means (EMM) (package R: “emmeans”) (Lenth *et al.* 2022).

3. Results

3.1. Aphid life history traits

There was a significant effect of the apple cultivar on the fresh mass of aphid nymphs (GLMM: $\chi^2 = 26.68$, Df = 2, $P < 0.001$). The fresh mass of aphid nymphs was significantly smaller when they were reared on Green Sleeves plants (EMM comparison; Gala vs Ariane, $P = 0.061$; Gala vs Green Sleeves, $P < 0.001$; Ariane vs Green Sleeves, $P = 0.006$) compared to nymphs reared on Gala or Ariane cultivars (figure 1a). The mean individual fresh mass was more than halved between nymphs reared on the Green Sleeves cultivar ($51.65 \pm 3.88 \mu\text{g}$) and the sensitive cultivar Gala ($116.42 \pm 6.18 \mu\text{g}$). The mean individual fresh mass of nymphs reared on Ariane ($90.83 \pm 5.95 \mu\text{g}$) was not significantly different from that of nymphs reared on Gala. However, in adults, there was no significant effect of the apple cultivar on the average fresh mass (GLMM:

$\chi^2 = 1.26$, Df = 2, P = 0.533) (EMM comparison; Gala vs Ariane, P = 0.405; Gala vs Green Sleeves, P = 0.126; Ariane vs Green Sleeves, P = 0.779) (figure 1b).

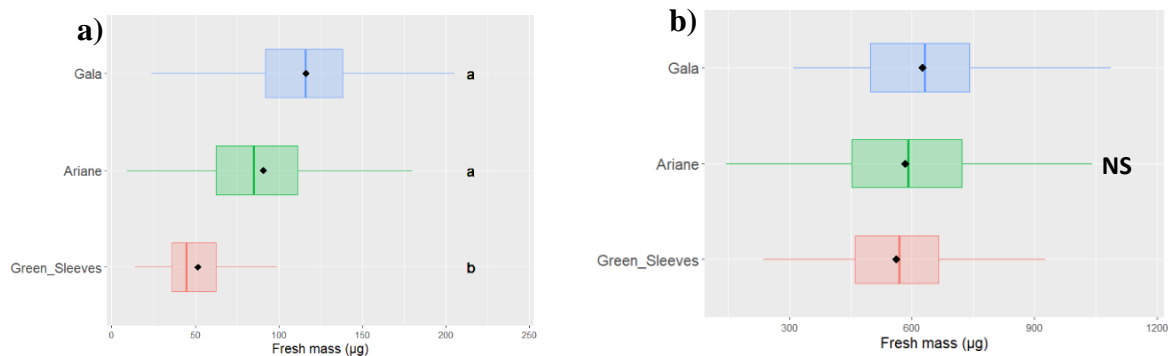


FIGURE 1 Mean individual fresh mass of *Dysaphis plantaginea* reared on each apple tree cultivar. **a** Fresh mass of four-day-old aphid nymphs. **b** Fresh mass of 10-day-old aphid adults. Box plots show mean (black dots). Different letters indicate significant differences at the 5% threshold (post-hoc EMM pairwise comparisons). NS: not significant

There was a significant effect of the apple cultivar on the mean individual fat mass of adult nymphs (GLMM: $\chi^2 = 12.76$, Df = 2, P = 0.001), whereas the mean individual fat mass of aphid adults was not significantly different (GLMM: $\chi^2 = 1.26$, Df = 2, P = 0.531) (figure 2a).

For adults, EMM post hoc pairwise comparison revealed that the mean individual fat mass of aphids reared on Green Sleeves was significantly greater than that of aphids reared on Ariane but was not significantly different from that of aphids reared on Gala (EMM comparison; Gala vs Ariane, P = 0.196; Gala vs Green Sleeves, P = 0.178, Ariane vs Green Sleeves, P = 0.001). The mean individual fat mass of adults was 44.19 ± 2.27 µg for aphids reared on Gala, 33.54 ± 2.17 µg for those reared on Ariane and 54.25 ± 2.78 µg for those reared on Green Sleeves (figure 2b).

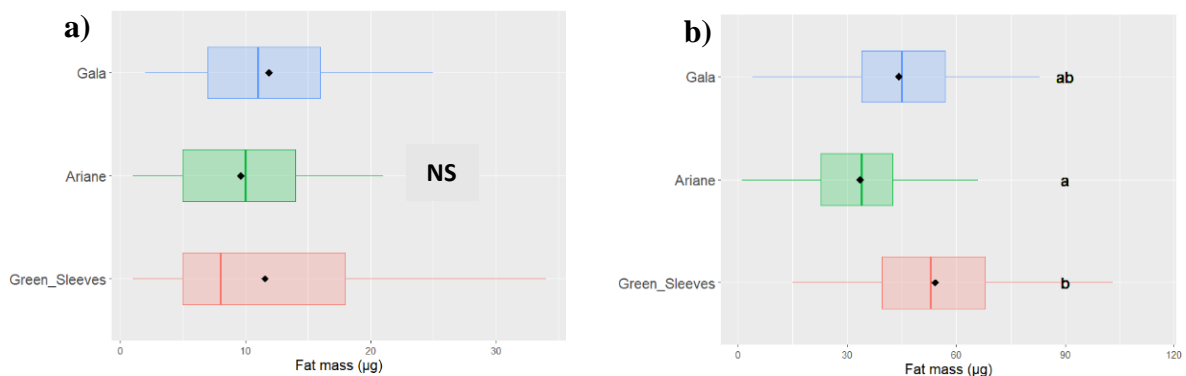


FIGURE 2 Mean individual fat mass (µg) of *Dysaphis plantaginea* reared on each apple tree cultivar. **a** Fat mass of four-day-old aphid nymphs. **b** Fat mass of 10-day-old aphid adults. Box

plots show mean (black dots). Different letters indicate significant differences at the 5% threshold (post-hoc EMM pairwise comparisons). NS: not significant.

The mean individual fat content was significantly different for aphid adults depending on the cultivar on which aphids had been reared (GLMM: $\chi^2 = 25.99$, Df = 2, $P < 0.001$). Mean individual fat contents were significantly lower for aphids reared on Gala ($28.73 \pm 1.26\%$) and Ariane ($24.33 \pm 1.24\%$) compared to the mean individual fat content of aphids on Green Sleeves ($32.24 \pm 1.40\%$) (EMM comparison; Gala vs Ariane, $P = 0.124$, Gala vs Green Sleeves, $P = 0.006$, Ariane vs Green Sleeves, $P < 0.001$) (figure 3b).

However, the mean individual fat content was not significantly different for aphid nymphs (GLMM: $\chi^2 = 1.01$, Df = 2, $P = 0.605$) (EMM comparison; Gala vs Ariane, $P = 0.966$; Gala vs Green Sleeves, $P = 0.602$; Ariane vs Green Sleeves, $P = 0.728$) (figure 3a).

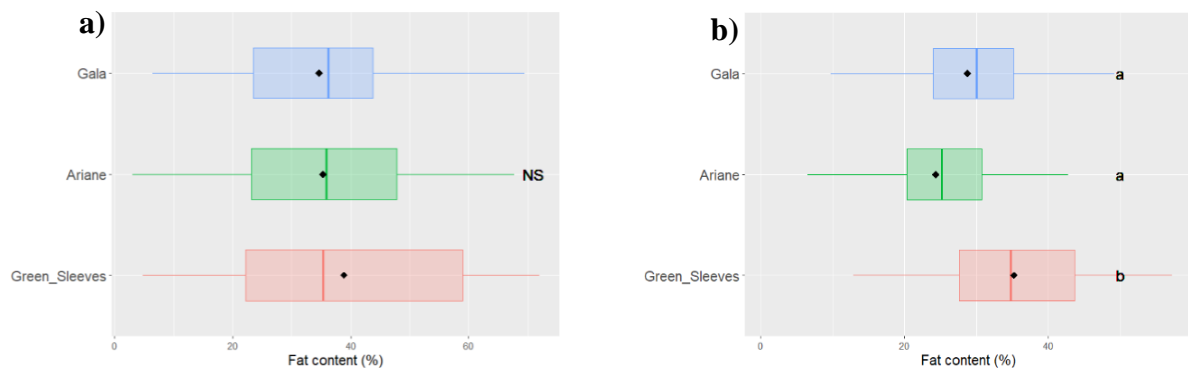


FIGURE 3 Mean individual fat content (%) of *Dysaphis plantaginea* reared on each apple tree cultivar. **a** Fat content of four-day-old aphid nymphs. **b** Fat content of 10-day-old aphid adults. Box plots show mean (black dots). Different letters indicate significant differences at the 5% threshold (post-hoc EMM pairwise comparisons). NS: Not significant.

There was a significant effect of the apple cultivar on the mean individual water content of aphid nymphs and adults (Nymphs, GLMM: $\chi^2 = 69.35$, Df = 2, $P < 0.001$. Adults, GLMM: $\chi^2 = 39.72$, Df = 2, $P < 0.001$).

The mean individual water content of aphid nymphs was significantly smaller when they were reared on Green Sleeves ($47.17 \pm 2.35\%$) compared to that of nymphs reared on Gala or Ariane ($71.37 \pm 0.67\%$ for Gala and $71.44 \pm 0.68\%$ for Ariane) (EMM comparison; Gala vs Ariane, $P = 0.986$; Gala vs Green Sleeves, $P < 0.001$; Ariane vs Green Sleeves, $P < 0.001$) (figure 4a).

The mean individual water content of aphid adults was significantly different for aphids depending on the host plant cultivar. It was smaller for aphids reared on Green Sleeves ($72.29 \pm 0.37\%$), intermediate for those reared on Gala ($75.08 \pm 0.43\%$) and greater for those reared

on Ariane ($77.31 \pm 0.26\%$) (EMM comparison; Gala vs Ariane = 0.028; Gala vs Green Sleeves, $P = 0.001$, Ariane vs Green Sleeves, $P < 0.001$) (figure 4b).

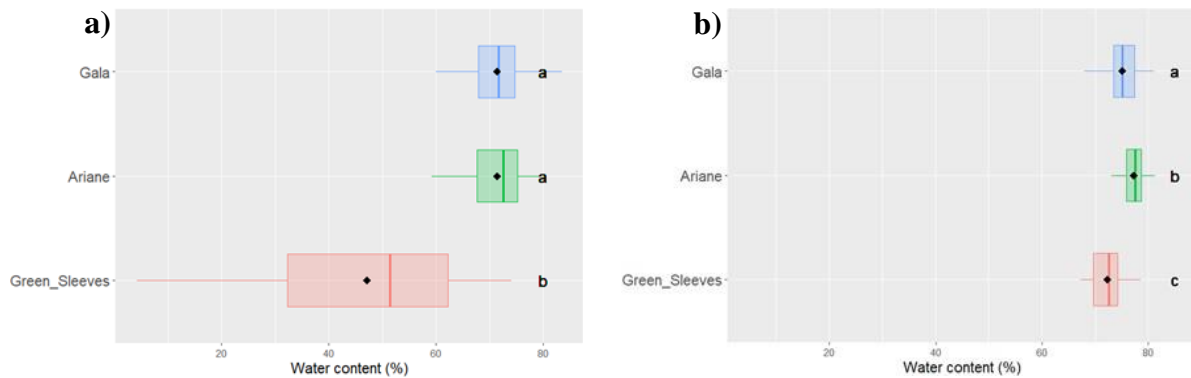


FIGURE 4 Mean individual water content (%) of *Dysaphis plantaginea* reared on each apple tree cultivar. **a** Water content of four-day-old aphid nymphs. **b** Water content of 10-day-old aphid adults. Box plots show mean. Different letters indicate significant differences at the 5% threshold (post-hoc EMM pairwise comparisons).

There was no significant effect of the apple cultivar on the pre-reproductive period of aphids (CPH model: $\chi^2 = 0.51$, $Df = 2$, $P = 0.78$). The average pre-reproductive period on the Gala cultivar was 11.05 ± 0.26 days, for aphids on Ariane it was 10.95 ± 0.36 days and for aphids on Green Sleeves 11.26 ± 0.34 days (EMM comparison, Gala vs Ariane, $P = 0.962$; Gala vs Green Sleeves, $P = 0.998$; Ariane vs Green Sleeves, $P = 0.933$) (figure 5).

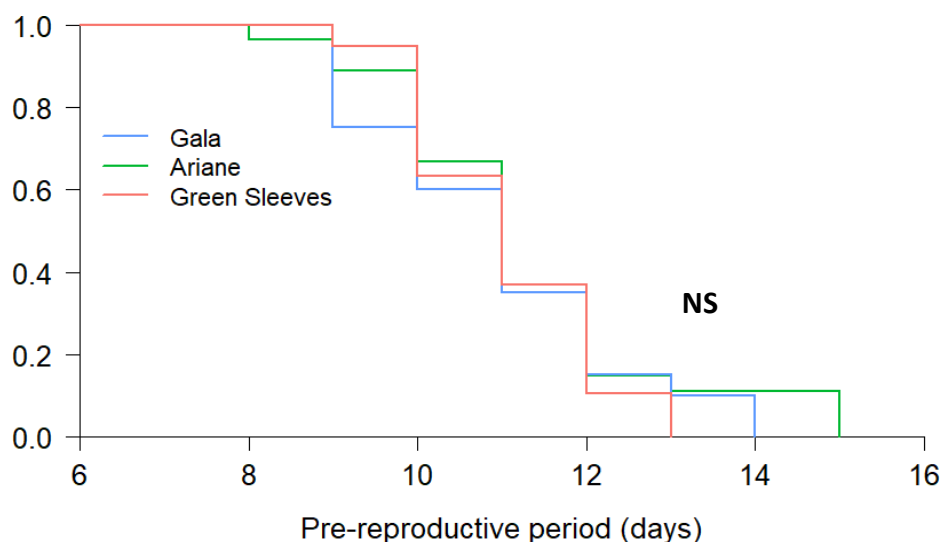


FIGURE 5 Pre-reproductive period (days) of *Dysaphis plantaginea* reared on each apple tree cultivar.

3.2. Aphid feeding behavior

The type of cultivar did affect the total duration of phloem sap ingestion by aphids (GLM: $\chi^2 = 32.44$, Df = 2, $P < 0.001$) (figure 6) and the proportion of aphids performing sustained phloem sap ingestion (>10 min) (χ^2 test of homogeneity, $\chi^2 = 21.98$, Df = 2, $P < 0.001$).

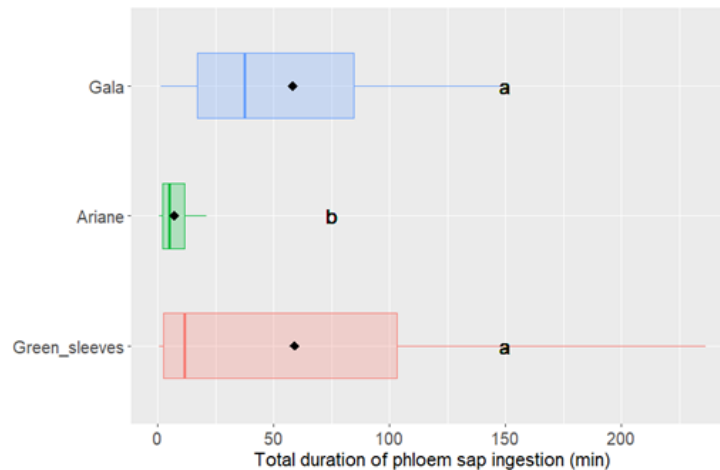


FIGURE 6 Total duration of phloem sap ingestion by *Dysaphis plantaginea* on each apple tree cultivar tested (min). Box plots show mean (black dots). Different letters indicate significant differences at the 5% threshold (post-hoc EMM pairwise comparisons).

The total duration of phloem sap ingestion was significantly shorter for aphids feeding on the Ariane cultivar (7.29 ± 1.55 min) compared to that of aphids on the Gala or Green Sleeves cultivars (58.29 ± 11.61 min and 59.03 ± 19.20 min, respectively) (EMM comparison; Gala vs Ariane, $P = 0.004$; Gala vs Green Sleeves, $P = 0.999$; Ariane vs Green Sleeves, $P = 0.004$) (figure 6). The proportion of aphids performing sustained phloem sap ingestion (>10 min) was significantly smaller on the two resistant cultivars (chi-square test: $\chi^2 = 21.98$, Df = 2, $P > 0.001$). It was 66.67% for aphids feeding on Gala, 7.70% for those feeding on Ariane and 25.80% for those feeding on Green Sleeves (post-hoc chi square test; Gala vs Ariane, $P > 0.001$; Gala vs Green Sleeves, $P = 0.004$, Ariane vs Green Sleeves, $P = 0.150$) (figure 7).

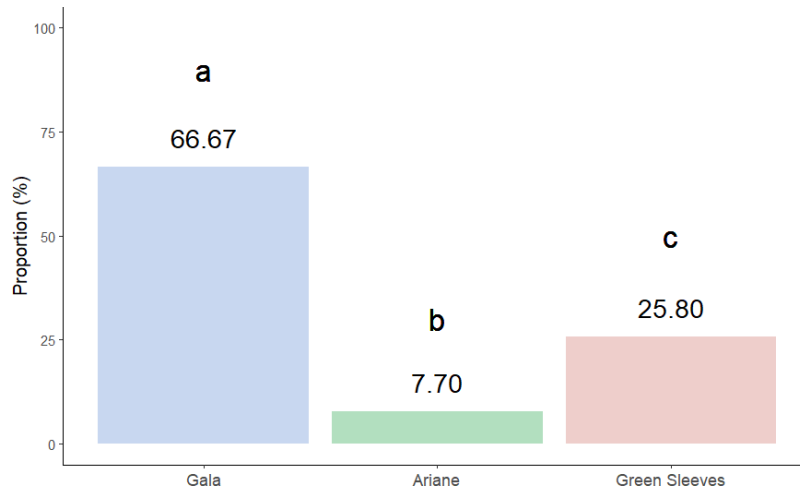


FIGURE 7 Proportion of *Dysaphis plantaginea* performing sustainable phloem sap ingestion on each apple tree cultivar tested (%). Different letters indicate significant at the 5% threshold (post-hoc using chi-square tests).

The number of probes (n_Pr) and the total duration of probing (s_Pr) were significantly different for aphids depending on the cultivar on which they fed (for n_Pr, GLM: $\chi^2 = 14.31$, Df=2, $P < 0.001$. For s_Pr, GLM: $\chi^2 = 8.01$, Df=2, $P < 0.018$). n_Pr and s_Pr were significantly smaller for aphids on the Gala cultivar compared to those of aphids on Ariane or Green Sleeves cultivars. The number of brief probing (n_bPr) was significantly smaller for aphids on Gala compared to aphids on Green Sleeves, and that of aphids on Ariane was not significantly different from those of aphids on the two other cultivars (GLM: $\chi^2 = 1.70$, Df=2, $P < 0.001$) (table 1). The total duration of xylem sap ingestion (s_G) was not significantly different depending on the apple cultivar at the 5% threshold ($\chi^2 = 5.59$, df=2, $P = 0.061$). However, it can be noted that this duration was the shortest for aphids on the Gala cultivar and the longest for those on the Ariane cultivar (table 1). None of the other EPG data linked to the pathway phase, the salivation phase or the derailed stylets phase showed any significant difference in aphid stylets activity according to the apple cultivar.

3.3. Parasitoid life history traits

The average development time was significantly different for parasitoids depending on the cultivar on which their aphid hosts had been reared (CPH: $\chi^2 = 6.47$, Df=2, $P = 0.039$). It was longer for parasitoids developed in aphids reared on Ariane (22.08 ± 0.23 days) or Green Sleeves (21.86 ± 0.19 days) compared to those reared on the sensitive cultivar Gala (20.45 ± 0.14 days) (figure 8) (EMM comparison; Gala vs Ariane, $P = 0.082$; Gala vs Green Sleeves, $P = 0.06$, Ariane vs Green Sleeves, $P = 0.927$). There was also a significant effect of the sex of the parasitoids on their development time, males developing faster than females, whatever the apple cultivar (CPH: $\chi^2 = 12.11$, Df=1, $P < 0.001$).

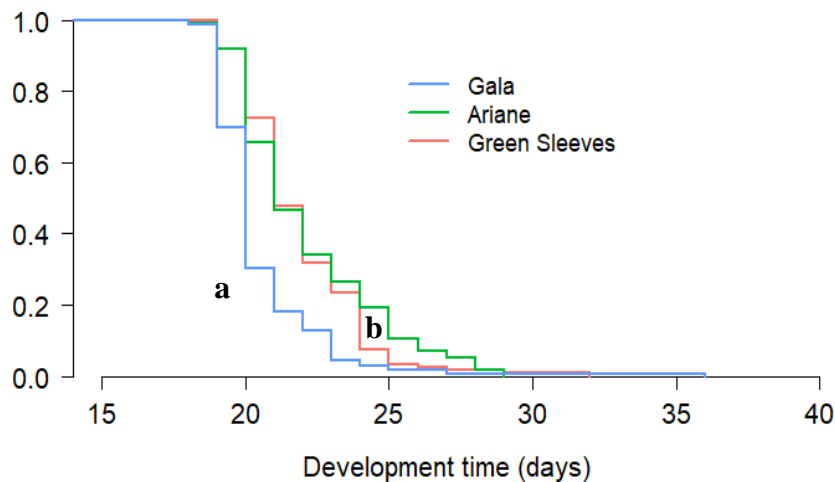


FIGURE 8 Development time (days) of *Ephedrus cerasicola* in aphids reared on different apple tree cultivars. Different letters indicate significant differences.

The parasitoids sex ratio was not significantly different depending on the cultivar on which the aphid host had been reared (GLMM: $\chi^2 = 0.57$, Df = 2, P = 0.752). There were 47.1% of female parasitoids emerging from aphids reared on the Gala cultivar, 45.0% of female parasitoids emerging from aphids reared on Ariane, and 46.8% of female parasitoids emerging from aphids reared on Green Sleeves (post-hoc chi-square test: Gala vs Ariane, P = 0.999; Gala vs Green Sleeves, P = 0.779; Ariane vs Green Sleeves, P = 0.800).

The mean egg load of emerged females was not significantly different depending on the cultivar on which aphid host had been reared (GLMM: $\chi^2 = 2.31$, Df = 2, P = 0.315). The mean egg load of parasitoids was 272.85 ± 18.96 eggs for those developing in aphids reared on Gala, 287.82 ± 17.04 eggs for those developing in aphids reared on the Ariane cultivar and 308.48 ± 15.77 eggs for those developing in aphids reared on the Green Sleeves cultivar (EMM comparison; Gala vs Ariane, P = 0.755; Gala vs Green Sleeves, P = 0.291; Ariane vs Green Sleeves, P = 0.740) (figure 9).

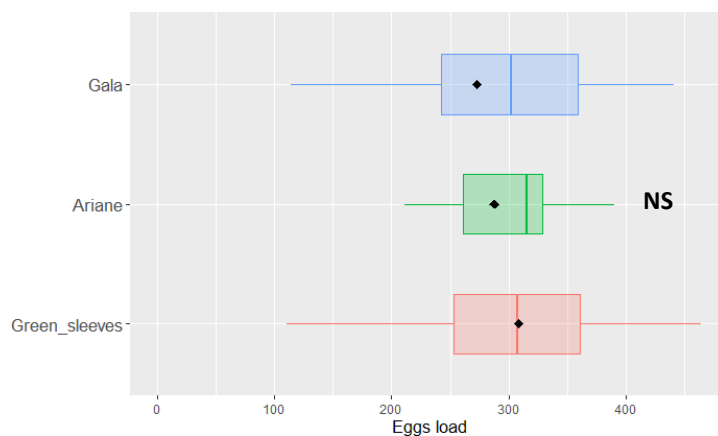


FIGURE 9 Mean egg load of *Ephedrus cerasicola* females on each apple tree cultivar where their aphid hosts were reared. Box plots show mean (black dots).

There was no significant effect of the apple cultivar on the tibia length of female and male parasitoids (GLMM: $\chi^2 = 4.12$, Df = 2, P = 0.128). The tibia length of female parasitoids developing on aphids reared on Gala cultivar was 0.555 ± 0.011 mm, for female parasitoids on Ariane it was 0.543 ± 0.012 mm and for those reared in aphids on Green Sleeves it was 0.585 ± 0.006 mm. The tibia length of male parasitoids developing in aphids reared on Gala cultivar was 0.494 ± 0.013 mm, for male parasitoids in aphids on Ariane it was 0.473 ± 0.013 mm and for those reared in aphids on Green Sleeves it was 0.507 ± 0.008 mm.

There was, however, a significant difference between the tibia size of females and males (GLMM: $\chi^2 = 99.85$, Df = 1, P < 0.001) (EMM comparison: females on Gala vs males on Gala, P < 0.001; females on Ariane vs males on Ariane, P = 0.001; females on Green Sleeves vs males on Green Sleeves, P < 0.001) (figure 10).

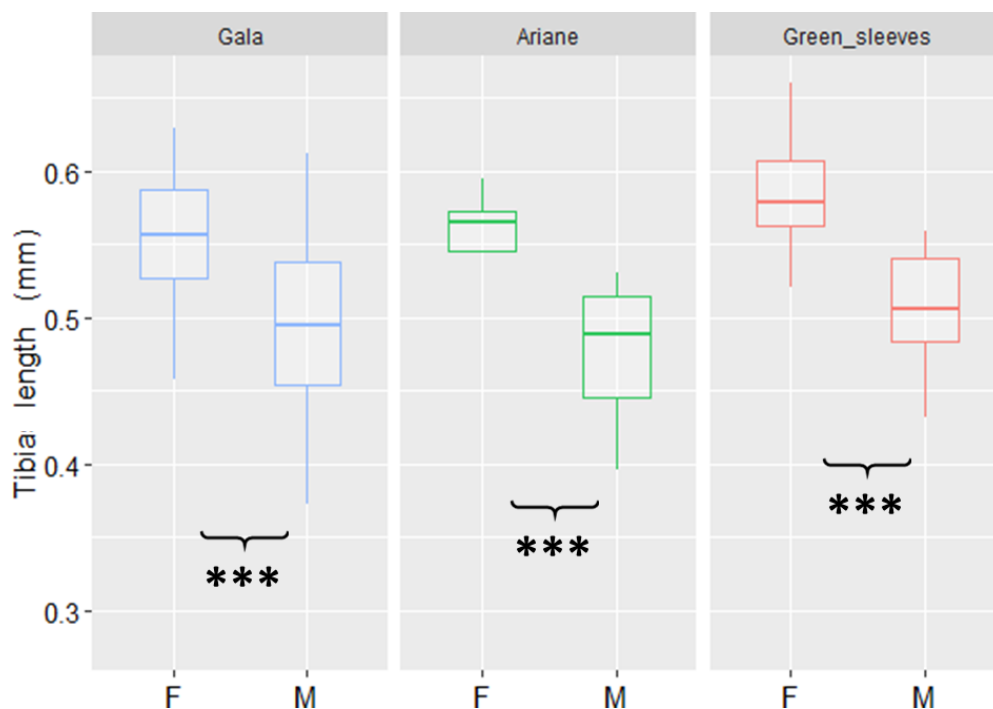


FIGURE 10 Mean tibia length (mm) of *Ephedrus cerasicola* on each apple tree cultivar where their aphid hosts were reared. F: females; M: males. Associated with a post-hoc EMM pairwise comparisons.

4. Discussion

Our experiments showed that intraspecific variability in apple cultivars could negatively impact the quality of host aphids in terms of nutritional resources for the parasitoids (lipid and water quantity). However, no effect could be observed on the fresh mass of adult aphids or their

development time. The biochemical and physiological modifications of some of these life history traits can be explained by a modification of the feeding behavior of aphids, especially during the phloem-related phases. These changes at the aphid level affected the developmental duration of parasitoids but not the other traits studied (e.g. egg load, tibia size and sex ratio). In our study, plant resistance therefore negatively impacted the aphids but appeared to have limited bottom-up effects on the parasitoids. These results therefore demonstrated that cultivar quality can be an important factor in tritrophic interactions.

Adult aphids reared on the resistant Ariane apple cultivar exhibited lower lipid masses and lipid contents than those reared on Green Sleeves, the other resistant cultivar. These results are consistent with other studies that have shown a reduction in the lipid content of aphids and other insects such as the lesser grain borer reared on low quality plants (Perez-Mendoza *et al.* 1999; Tabadkani *et al.* 2013). These differences in host quality can be explained by the physiological variability of *Malus sp.* at the intraspecific scale, such as photosynthetic activity and stomatal activity of plants due to differences in primary compounds between cultivars (Massonnet *et al.* 2007). Lower photosynthetic activity in a given cultivar could thus cause a decrease in the resources available for aphids in its phloem sap. Similarly, high stomatal activity could increase water evaporation and thus decrease the availability of water for aphids in the plant. In this way, we hypothesize that the Ariane cultivar could potentially have had a lower photosynthetic activity than the other cultivars, which would have resulted in the lower lipid mass observed for the aphids reared on this cultivar. We also suggest that the Green Sleeves cultivar could have had a higher stomatal conductance than the other cultivars, which would explain the lower water content measured in aphids reared on Green Sleeves. It might be interesting to conduct further experiments to test these suggestions. Furthermore, we hypothesize that the lack of significant difference in the lipid content of nymphs could be due to the time lag between aphid infestation and the establishment of plant-induced defense (Smith & Boyko 2007; Yin *et al.* 2013). It is known that the amount of energetic resources contained in the individuals increases with their fresh mass because the largest individuals will accumulate the most resources (Strohm 2000). However, contrary to what we expected, we did not observe any significant difference in the fresh mass of aphid adults depending on the cultivar, which is in contradiction with other studies on the subject (Martin & Johnson 2011; Kersch-Becker & Thaler 2015). This would mean that the composition of the phloem sap of the host plants on which aphids were feeding would have no impact on their fresh mass. Moreover, in our model we did not observe any effect of the cultivar on the development time of the aphids as it has been shown in other studies (Akköprü *et al.* 2015).

It is known that the quantity and quality of food consumed by aphids can impact their quality as resources for parasitoids (Souissi & Rü 1998). Studying the feeding behavior of aphids in relation to the cultivar on which they feed allowed us to explore whether possible changes in this type of behavior were at the origin of an alteration in the life history traits of parasitoids. The majority of the phloem-related variables of *D. plantaginea* feeding on the Ariane and Green Sleeves resistant cultivars exhibited a lower number or a shorter duration compared to the

phloem sap ingestion variables of aphids on the susceptible cultivar Gala. This is consistent with the work of Marchetti *et al.* 2009 on the feeding behavior of *D. plantaginea* on the resistant apple cultivar Florina. In their study, the altered feeding behavior of phloem related variables was attributed to the presence of resistance factors in the phloem sap tubes, and more specifically to the presence of phenolic compounds that would have prevented the aphids from feeding correctly and therefore reduced the number of ingestion phases, the total ingestion time and the proportion of aphids that performed an ingestion phase of phloem sap longer than 10 minutes. In our study, the observed decrease in the phloem sap feeding of aphids could thus explain the lower mass of lipids contained in aphids feeding on the Ariane cultivar, because the sugars assimilated by aphids are in part allocated to their lipid synthesis (Douglas 2003). Other studies have also observed a reduction in lipid mass in aphids and other insects such as the african fruit beetle or the lesser grain borer in response to reduced phloem sap feeding (Perez-Mendoza *et al.* 1999; Auerswald & Gade 2000; Tabadkani *et al.* 2013). However, in the study of Marchetti *et al.* 2009, the resistance of the Florina cultivar also impacted other variables of aphid feeding behavior that were not significantly different depending on aphids host plant cultivar in our study, such as the duration before the first probing phase, which would indicate in our case that the cultivars did not present repulsive factors on their surface contrary to what has been proposed for the Florina cultivar. Our results also showed that the duration of xylem sap ingestion by aphids was close to being significantly longer on the Ariane cultivar. We suppose that this result may be due to the difference in water balance between the apple cultivars (Massonnet *et al.* 2007) as well as the difficulty of aphids to feed on phloem sap. This would also explain why the water content of aphids was higher on the Ariane cultivar because the ingestion of xylem sap allows to regulate the water balance of aphids (Spiller *et al.* 1990; Pompon *et al.* 2010). The study of the other feeding behavior variables did not allow us to suggest the existence of other resistance factors in the two tested resistant cultivars. The variables related to the phases in the mesophyll and salivation were not significantly different depending on aphids host plant cultivar. Although those related to the number of probes and brief probes were significantly greater on the Ariane and Green Sleeves cultivars, this could be due to repeated probing in order to successfully reach and ingest phloem sap. Finally, we did not observe any difference between aphid behavior on the different cultivars for the stylet derailment variables, however this data is difficult to interpret as it is still unknown what triggers this behavior in aphids. Overall, our EPG results seemed to indicate a resistance to aphids of the Green Sleeves cultivar and more particularly of the Ariane one which would be based on the presence of resistance factors at the level of the phloem sap tubes.

Therefore, although the amount of resources available (fresh mass) to the parasitoids during their development in their aphid host was unchanged, the quality of these resources (lipid and water content) was significantly affected depending on the apple cultivar on which their aphid host had been reared. Further analysis of this model would allow a better understanding and evaluation of the quality of resources contained in aphid hosts for their parasitoids.

During our analyses of the parasitoids life history traits, only one of the studied parameters reflecting the performance of the parasitoids according to the host plant cultivar of their aphid host was significantly different. The development time of the parasitoids was found to be longer when their aphid hosts were reared on the aphid-resistant Ariane and Green Sleeves cultivars. This difference in developmental time could not be attributed to a cascade effect of aphid developmental delay across cultivars since none was observed. So, this was more likely due to the difference in resources that aphids represented for parasitoids. The amount of lipids contained in their host is important for parasitoids as they are not able to perform lipogenesis (Visser & Ellers 2008). However, this is not the only resource on which they depend during their development. Other resources such as amino acids or carbohydrates are also necessary for their development. For example, Coskun & Emre (2015) demonstrated that a reduced amino acid diet for parasitoids had an impact on their development and could decrease the proportion of parasitoids reaching emergence. An increase in the development time of *Aphidius colemani* was also observed when it developed in *M. persicae* feeding on resistant common cabbage plants (Kalule & Wright 2005).

Parasitoids size at emergence is usually related to the resources available in their hosts during their development (Kaplan *et al.* 2016; Pirotte *et al.* 2018). Since we observed a lower lipid content in aphids reared on the Ariane cultivar, we expected to observe a significant difference in parasitoids tibia size depending on the cultivar of their hosts as demonstrated in other studies (Harvey *et al.* 1995), which was not the case. This result could be explained by the fact that a trade-off between the size and the development time of parasitoids occurred (Nylin & Gotthard 1998; Colinet *et al.* 2007). Therefore, it can be suggested that in our model, parasitoids developing in aphids on resistant apple cultivars favored their growth and accumulation of reserves (ie. size) by increasing their development time. Lipids are known to be directly involved in egg production for parasitoids (Ellers & Van Alphen 1997; Zhao & Zera 2002). Therefore, we could have suggested that parasitoids that developed in aphids reared on the Green Sleeves and Gala cultivars would have exhibited a higher egg load, as the aphids had a greater lipid mass than those reared on the Ariane cultivar. However, this parameter was not significantly different either. This could be explained by the fact that in parasitoids, egg load is usually positively correlated with size (King 1988; Visser 1994). Size being unchanged in our study, the egg load was not modified. This result also supports the possible trade-off between size and development duration.

Sex ratio of the emerging parasitoids was not significantly different according to the apple cultivar on which their aphid host developed. This is not consistent with what we would have expected. Indeed, female aphid parasitoids have the ability to manipulate the sex ratio of their offspring and usually prefer to lay female eggs in large hosts, supposedly containing more resources, in order to maximize their fitness (King 1987). As aphids were offered to parasitoids at an early nymphal stage and that at this stage the measured fresh mass of aphids was found to be smaller for those reared on the Green Sleeves, we expected to observe a bias in favor of males for parasitoids developed in aphids reared on this cultivar.

Altogether we can therefore deduce that in our study, the size of the tibias, the egg load and the sex ratio of the parasitoids were not affected by the quality of the plants.

To conclude, our results showed that both resistant apple cultivars, Ariane and Green Sleeves, had a negative impact on higher trophic levels, especially that of aphids. We suggest that the minor effects of both resistant cultivars on parasitoids compared to their higher negative effects on aphid life history traits and feeding behavior could be due to a buffer effect on the aphid trophic level, thus reducing the negative effects of plant resistance as it was proposed by Chesnais *et al.* (2016). In a field application context, our results suggest that the search for new resistant cultivars may not hinder the performance of parasitoids and their ability to regulate aphid pests populations. These results appear encouraging in the context of integrated crop protection by biological control, which aims to free itself from phytosanitary products.

Supplementary material

SUPPLEMENTARY TABLE 1 Feeding behavior parameters of *Dysaphis plantaginea* on the three tested cultivars of *Malus domestica*

	Aphids on Gala	Aphids on Ariane	Aphids on Green Sleeves	Statistics
General probing phase (Pr)	n = 27	n = 26	n = 31	
Number of probes (n_Pr)	16.41 ± 1.89 a	19.38 ± 1.94 b	19.61 ± 2.31 b	$\chi^2 = 14.31, df = 2, P < 0.001$
Number of brief probing (n_bPr)	9.81 ± 1.52 a	11.48 ± 1.63 ab	13.03 ± 2.07 b	$\chi^2 = 1.70, df = 2, P < 0.001$
Total duration of probing (min. s_Pr)	392.87 ± 9.00 a	330.06 ± 9.28 b	344.80 ± 14.15 b	$\chi^2 = 8.01, df = 2, P = 0.018$
Time to first probe (min. t>1Pr)	22.10 ± 6.42	21.85 ± 3.52	18.20 ± 3.65	$\chi^2 = 0.49, df = 2, P = 0.782$
Pathway phase (C)	n = 27	n = 26	n = 31	
Number of pathway phase (n_C)	25.44 ± 1.84	24.04 ± 2.02	25.48 ± 2.22	$\chi^2 = 0.31, df = 2, P = 0.855$
Total duration of pathways phases (min. s_C)	251.83 ± 13.82	262.22 ± 15.52	228.227 ± 16.23	$\chi^2 = 2.61, df = 2, P = 0.271$
Phloem phase (E)	n = 25	n = 19	n = 22	
Number of salivation phases (n_E1)	5.84 ± 0.93	3.84 ± 0.45	4.82 ± 0.92	$\chi^2 = 3.18, df = 2, P = 0.204$
Total duration of salivation phase (min. s_E1)	7.91 ± 1.29	4.98 ± 0.58	7.59 ± 1.32	$\chi^2 = 4.58, df = 2, P = 0.101$
	n = 23	n = 18	n = 18	
Number of phloem sap ingestion phases (n_E2)	5.78 ± 0.89 a	2.67 ± 0.39 b	4.50 ± 0.94 ab	$\chi^2 = 10.07, df = 2, P = 0.006$
Total duration of phloem sap ingestion phase (min. s_E2)	58.29 ± 11.61 a	7.29 ± 1.54 b	59.03 ± 19.205 a	$\chi^2 = 32.44, df = 2, P < 0.001$
Time to first phloem sap ingestion phases (min. t>1E2)	175.21 ± 29.56	217.90 ± 28.13	201.95 ± 29.02	$\chi^2 = 5.07, df = 2, P = 0.579$
	n = 18	n = 2	n = 8	
Number of sustained phloem sap ingestion (n_sE2)	2.11 ± 0.34	1.00 ± 0.00	1.75 ± 0.25	$\chi^2 = 2.52, df = 2, P = 0.283$
Other phases (G and F)	n = 3	n = 7	n = 11	
Number of xylem sap ingestion (n_G)	1.67 ± 0.67	1.00 ± 0.00	1.55 ± 0.28	$\chi^2 = 3.57, df = 2, P = 0.552$
Total duration of xylem sap ingestion (s_G) (min)	28.45 ± 20.55	98.90 ± 10.61	56.74 ± 13.95	$\chi^2 = 5.59, df = 2, P = 0.061$
	n = 15	n = 9	n = 18	
Number of derailed stylet phases (n_F)	2.47 ± 0.24	2.89 ± 1.11	3.28 ± 0.50	$\chi^2 = 1.30, df = 2, P = 0.522$
Total duration of derailed stylet phase (min. s_F)	80.76 ± 12.19	63.63 ± 16.75	89.97 ± 12.82	$\chi^2 = 1.68, df = 2, P = 0.431$

References

- Agrawal, A.A. (2000). Mechanisms, ecological consequences and agricultural implications of tri-trophic interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 329–335.
- Akköprü, E.P., Atlıhan, R., Okut, H. & Chi, H. (2015). Demographic Assessment of Plant Cultivar Resistance to Insect Pests: A Case Study of the Dusky-Veined Walnut Aphid (Hemiptera: Callaphididae) on Five Walnut Cultivars. *Journal of Economic Entomology*, 108, 378–387.
- Auerswald, L. & Gäde, G. (2000). Metabolic changes in the African fruit beetle, *Pachnoda sinuata*, during starvation. *Journal of Insect Physiology*, 46, 343–351.
- Bailey, J.K., Wooley, S.C., Lindroth, R.L. & Whitham, T.G. (2006). Importance of species interactions to community heritability: a genetic basis to trophic-level interactions. *Ecology Letters*, 9, 78–85.
- Barbour, M.A., Fortuna, M.A., Bascompte, J., Nicholson, J.R., Julkunen-Tiitto, R., Jules, E.S., et al. (2016). Genetic specificity of a plant–insect food web: Implications for linking genetic variation to network complexity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, 2128–2133.
- Chesnais, Q., Couty, A., Catterou, M. & Ameline, A. (2016). Cascading effects of N input on tritrophic (plant–aphid–parasitoid) interactions. *Ecology and Evolution*, 6, 7882–7891.
- Chevreau, E., Brisset, M.N., Paulin, J.P. & James, D.J. (1998). Fire blight resistance and genetic trueness-to-type of four somaclonal variants from the apple cultivar Greensleeves. *Euphytica*, 104, 199–205.
- Colinet, H., Boivin, G. & Hance, Th. (2007). Manipulation of parasitoid size using the temperature-size rule: fitness consequences. *Oecologia*, 152, 425–433.
- Coskun, M. & Emre, I. (2015). Role of Lipids, Amino Acids, and Sucrose on the Total Adult and Female Emergence, and Content of Glycogen and Protein in *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 108, 820–826.
- Crutsinger, G.M., Collins, M.D., Fordyce, J.A., Gompert, Z., Nice, C.C. & Sanders, N.J. (2006). Plant Genotypic Diversity Predicts Community Structure and Governs an Ecosystem Process. *Science*, 313, 966–968.
- Douglas, A. (2003). *The Nutritional Physiology of Aphids*. Elsevier.
- Druat, P. (1997). Optimization of culture media for in vitro rooting of *Malus domestica* Borkh. cv. compact Spartan. *Biol. Plant.*, 67–77.
- Ellers, J. & Van Alphen, J.J.M. (1997). Life history evolution in *Asobara tabida*: plasticity in allocation of fat reserves to survival and reproduction. *Journal of Evolutionary Biology*, 10, 771–785.
- Giordanengo, P. (2014). EPG-Calc: a PHP-based script to calculate electrical penetration graph (EPG) parameters. *Arthropod-Plant Interactions*, 8, 163–169.
- Gols, R., Bukovinszky, T., van Dam, N.M., Dicke, M., Bullock, J.M. & Harvey, J.A. (2008). Performance of Generalist and Specialist Herbivores and their Endoparasitoids Differs on Cultivated and Wild Brassica Populations. *J Chem Ecol*, 34, 132–143.
- Harvey, J.A. & Gols, R. (2018). Effects of plant-mediated differences in host quality on the development of two related endoparasitoids with different host-utilization strategies. *Journal of Insect Physiology*, 107, 110–115.
- Harvey, J.A., Harvey, I.F. & Thompson, D.J. (1995). The effect of host nutrition on growth and development of the parasitoid wasp *Venturia canescens*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 75, 213–220.
- Harvey, J.A. & Strand, M.R. (2002). The Developmental Strategies of Endoparasitoid Wasps Vary with Host Feeding Ecology. *Ecology*, 83, 2439–2451.

- Kaiser, L., Ode, P., van Nouhuys, S., Calatayud, P.-A., Colazza, S., Cortesero, A.-M., *et al.* (2017). Chapter Six - The Plant as a Habitat for Entomophagous Insects. In: *Advances in Botanical Research*, Insect-Plant Interactions in a Crop Protection Perspective (eds. Sauvion, N., Thiéry, D. & Calatayud, P.-A.). Academic Press, pp. 179–223.
- Kalule, T. & Wright, D. (2005). Effect of cultivars with varying levels of resistance to aphids on development time, sex ratio, size and longevity of the parasitoid *Aphidius colemani*. *BioControl*, 50, 235–246.
- Kaplan, I., Carrillo, J., Garvey, M. & Ode, P.J. (2016). Indirect plant–parasitoid interactions mediated by changes in herbivore physiology. *Current Opinion in Insect Science, Ecology * Parasites/Parasitoids/Biological control*, 14, 112–119.
- Karimzadeh, J. & Wright, D.J. (2008). Bottom-up cascading effects in a tritrophic system: interactions between plant quality and host-parasitoid immune responses. *Ecological Entomology*, 33, 45–52.
- Kersch-Becker, M.F. & Thaler, J.S. (2015). Plant resistance reduces the strength of consumptive and non-consumptive effects of predators on aphids. *Journal of Animal Ecology*, 84, 1222–1232.
- King, B.H. (1987). Offspring Sex Ratios in Parasitoid Wasps. *The Quarterly Review of Biology*, 62, 367–396.
- King, B.H. (1988). Sex-Ratio Manipulation in Response to Host Size by the Parasitoid Wasp *Spalangia Cameroni*: A Laboratory Study. *Evolution*, 42, 1190–1198.
- Laurens, F., Lespinasse, Y. & Fouillet, A. (2005). A New Scab-resistant Apple: “Ariane.” *HortScience*, 40.
- Le Lann, C., Visser, B., van Baaren, J., van Alphen, J.J.M. & Ellers, J. (2012). Comparing resource exploitation and allocation of two closely related aphid parasitoids sharing the same host. *Evol Ecol*, 26, 79–94.
- Lenth, R.V., Singmann, H., Love, J., Buerkner, P. & Herve, M. (2022). *emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means*. Available at: <https://rdrr.io/cran/emmeans/>. Last accessed 27 June 2022.
- López-Goldar, X., Villari, C., Bonello, P., Borg-Karlson, A.K., Grivet, D., Zas, R., *et al.* (2018). Inducibility of Plant Secondary Metabolites in the Stem Predicts Genetic Variation in Resistance Against a Key Insect Herbivore in Maritime Pine. *Frontiers in Plant Science*, 9.
- Macfadyen, S. & Bohan, D.A. (2010). Crop domestication and the disruption of species interactions. *Basic and Applied Ecology*, 11, 116–125.
- Marchetti, E., Civolani, S., Leis, M., Chicca, M., Tjallingii, W.F., Pasqualini, E., *et al.* (2009). Tissue location of resistance in apple to the rosy apple aphid established by electrical penetration graphs. *Bulletin of Insectology*, 62, 6.
- Martin, P. & Johnson, S.N. (2011). Evidence that elevated CO₂ reduces resistance to the European large raspberry aphid in some raspberry cultivars. *Journal of Applied Entomology*, 135, 237–240.
- Massonnet, C., Costes, E., Rambal, S., Dreyer, E. & Regnard, J.L. (2007). Stomatal Regulation of Photosynthesis in Apple Leaves: Evidence for Different Water-use Strategies between Two Cultivars. *Annals of Botany*, 100, 1347–1356.
- Miñarro, M. & Dapena, E. (2007). Resistance of Apple Cultivars to *Dysaphis plantaginea* (Hemiptera: Aphididae): Role of Tree Phenology in Infestation Avoidance. *Environmental entomology*, 36, 1206–11.
- Moon, D.C., Rossi, A.M. & Stiling, P. (2000). The effects of abiotically induced changes in host plant quality (and morphology) on a salt marsh planthopper and its parasitoid. *Ecological Entomology*, 25, 325–331.

- Nylin, S. & Gotthard, K. (1998). Plasticity in Life-History Traits. *Annu. Rev. Entomol.*, 43, 63–83.
- Ode, P.J. (2006). PLANT CHEMISTRY AND NATURAL ENEMY FITNESS: Effects on Herbivore and Natural Enemy Interactions. *Annu. Rev. Entomol.*, 51, 163–185.
- O'Reilly-Wapstra, J.M., Iason, G.R. & Thoss, V. (2007). The role of genetic and chemical variation of *Pinus sylvestris* seedlings in influencing slug herbivory. *Oecologia*, 152, 82–91.
- Perez-Mendoza, J., Dover, B. a., Hagstrum, D. w. & Hopkins, T. l. (1999). Effect of crowding, food deprivation, and diet on flight initiation and lipid reserves of the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 91, 317–326.
- Pirotte, J.A.-L.M., Lorenzi, A., Foray, V. & Hance, T. (2018). Impact of differences in nutritional quality of wingless and winged aphids on parasitoid fitness. *Journal of Experimental Biology*, 221, jeb185645.
- Pompon, J., Quiring, D., Giordanengo, P. & Pelletier, Y. (2010). Role of xylem consumption on osmoregulation in *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas). *Journal of Insect Physiology*, 56, 610–615.
- Rapusas, H.R. & Heinrichs, E.A. (1990). Feeding Behavior of *Nephotettix virescens* (Homoptera: Cicadellidae) on Rice Varieties with Different Levels of Resistance. *Environmental Entomology*, 19, 594–602.
- Rivero, A. & West, S.A. (2005). The costs and benefits of host feeding in parasitoids. *Animal Behaviour*, 69, 1293–1301.
- Smith, C.M. & Boyko, E.V. (2007). The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding: current status. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 122, 1–16.
- Souissi, R. & Rü, B.L. (1998). Influence of the host plant of the cassava mealybug *Phenacoccus manihoti* (Hemiptera: Pseudococcidae) on biological characteristics of its parasitoid *Apoanagyrus lopezi* (Hymenoptera: Encyrtidae). *Bulletin of Entomological Research*, 88, 75–82.
- Spiller, N. j., Koenders, L. & Tjallingii, W. f. (1990). Xylem ingestion by aphids – a strategy for maintaining water balance. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 55, 101–104.
- Stiling, P. & Moon, D.C. (2005). Quality or quantity: the direct and indirect effects of host plants on herbivores and their natural enemies. *Oecologia*, 142, 413–420.
- Stoepler, T.M., Lill, J.T. & Murphy, S.M. (2011). Cascading effects of host size and host plant species on parasitoid resource allocation. *Ecological Entomology*, 36, 724–735.
- Strohm, E. (2000). Factors affecting body size and fat content in a digger wasp. *Oecologia*, 123, 184–191.
- Tabadkani, S.M., Ahsaei, S.M., Hosseinaveh, V. & Nozari, J. (2013). Food stress prompts dispersal behavior in apterous pea aphids: Do activated aphids incur energy loss? *Physiology & Behavior*, 110–111, 221–225.
- Thaler, J.S., Fidantsef, A.L. & Bostock, R.M. (2002). Antagonism Between Jasmonate- and Salicylate-Mediated Induced Plant Resistance: Effects of Concentration and Timing of Elicitation on Defense-Related Proteins, Herbivore, and Pathogen Performance in Tomato. *J Chem Ecol*, 28, 1131–1159.
- Therneau, T.M. & Grambsch, P.M. (2000). *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model*. Springer Science & Business Media, New York.
- Tjallingii, W.F. (1988). Electrical recording of stylet penetration activities. *Aphids, their biology, natural enemies and control*, 95–108.
- Tougeron, K., Devogel, M., van Baaren, J., Le Lann, C. & Hance, T. (2020). Trans-generational effects on diapause and life-history-traits of an aphid parasitoid. *Journal of Insect Physiology*, 121, 104001.

- Turlings, T.C.J., Tumlinson, J.H. & Lewis, W.J. (1990). Exploitation of Herbivore-Induced Plant Odors by Host-Seeking Parasitic Wasps. *Science*, 250, 1251–1253.
- Underwood, N. (2009). Effect of genetic variance in plant quality on the population dynamics of a herbivorous insect. *Journal of Animal Ecology*, 78, 839–847.
- Visser, B. & Ellers, J. (2008). Lack of lipogenesis in parasitoids: A review of physiological mechanisms and evolutionary implications. *Journal of Insect Physiology*, 54, 1315–1322.
- Visser, M.E. (1994). The Importance of Being Large: The Relationship between Size and Fitness in Females of the Parasitoid *Aphaereta minuta* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Animal Ecology*, 63, 963–978.
- War, A.R., Paulraj, M.G., Ahmad, T., Buhroo, A.A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., *et al.* (2012). Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling & Behavior*, 7, 1306–1320.
- Wimp, G.M., Martinsen, G.D., Floate, K.D., Bangert, R.K. & Whitham, T.G. (2005). Plant Genetic Determinants of Arthropod Community Structure and Diversity. *Evolution*, 59, 61–69.
- Wu, J. & Baldwin, I.T. (2009). Herbivory-induced signalling in plants: perception and action. *Plant, Cell & Environment*, 32, 1161–1174.
- Yin, L., Zou, Y., Ke, X., Liang, D., Du, X., Zhao, Y., *et al.* (2013). Phenolic responses of resistant and susceptible *Malus* plants induced by *Diplocarpon mali*. *Scientia Horticulturae*, 164, 17–23.
- Zehnder, G.W., Nichols, A.J., Edwards, O.R. & Ridsdill-Smith, T.J. (2001). Electronically monitored cowpea aphid feeding behavior on resistant and susceptible lupins. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 98, 259–269.
- Zhao, Z. & Zera, A.J. (2002). Differential lipid biosynthesis underlies a tradeoff between reproduction and flight capability in a wing-polymorphic cricket. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 16829–16834.



OPEN Genetic structure of *Malus sylvestris* and potential link with preference/performance by the rosy apple aphid pest *Dysaphis plantaginea*

Author: Thomas Denoirjean¹, Géraldine Doury¹, Amandine Cornille², Xilong Chen², Thierry Hance³ & Arnaud Ameline^{1*}

¹ UMR CNRS 7058 EDYSAN (Écologie et Dynamique des Systèmes Anthropisés), Université de Picardie Jules Verne, 33 rue St Leu, 80039 Amiens Cedex, France.

² Université Paris Saclay, INRAE, CNRS, AgroParisTech, GQE – Le Moulon, 91190 Gif-sur-Yvette, France.

³ Earth and Life Institute, Biodiversity Research Centre, UC Louvain, ELIB – Croix du sud 4–5 bte L7.07.04, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgium. *email: arnaud.ameline@u-picardie.fr

Abstract

The European crabapple *Malus sylvestris*, a crop wild relative of *Malus domestica*, is a major contributor to the cultivated apple genome and represents a potential source of interesting alleles or genes, particularly pest resistance traits. An original approach was used to explore the trophic interaction between *M. sylvestris* populations and its pest, the rosy apple aphid (*Dysaphis plantaginea*). Using 13 microsatellite markers, population genetic structure and level of crop-to-wild introgressions were inferred between *M. sylvestris* seedlings from three sites in Europe (Denmark, France, Romania), and *M. domestica* seedlings. Genetically characterized plants were also used to analyze aphid feeding behavior and fitness parameters. First, aphids submitted to two genetically close *M. sylvestris* populations (the Danish and French) exhibited similar behavioral parameters, suggesting similar patterns of resistance in these host plants. Second, the Romanian *M. sylvestris* population was most closely genetically related to *M. domestica*. Although the two plant genetic backgrounds were significantly differentiated, they

showed comparable levels of sensitivity to *D. plantaginea* infestation. Third, aphid fitness parameters were not significantly impacted by the host plant's genetic background. Finally, crop-to-wild introgression seemed to significantly drive resistance to *D. plantaginea* independent of host plant population genetic structure, with hybrids being less suitable hosts.

1. Introduction

Intense farming practices can lead to harmful impacts on the environment and human health. It is therefore urgent to promote eco-friendly agricultural management while feeding a growing world population¹. In this case, new breeding strategies making use of wild untapped genetic diversity could become a promising opportunity to provide farmers with crops less dependent on chemical inputs without heavy drawbacks to productivity². Crop breeding programs often rely on wild species that are either phylogenetically close to a crop and/or that have played a primary role in the crop domestication history. Such plants have been named “crop wild relatives” (or CWR). Although the use of CWR in breeding programs has the potential to fulfill numerous agronomic needs (e.g. yield increase or abiotic stress adaptation), the major focus of CWR research concerns their ability to enhance crop resistance against pathogens and pests³. In the context of breeding programs relying on CWR genetic traits, the cultivated apple tree *Malus domestica* Borkh appears to be an ideal model system for reducing the environmental impacts of food production. Indeed, *M. domestica* is one of the most important fruit tree crops in the world (<http://faostat.fao.org/>). In Europe, the apple tree is severely attacked by several pests and pathogens, and therefore apple production relies heavily on the use of pesticides. To reduce reliance on pesticide applications, apple breeding programs should test potential sources of resistance alleles such as the three potential local wild apple species in Eurasia. Population genetics analyses revealed that the cultivated *M. domestica* originated from the wild apple *Malus sieversii* Ledeb. in the Tian Shan mountains located in Central Asia^{4,5}. From there, the cultivated apple continued its journey along the Silk Routes where it hybridized with local wild apple tree species: first to a little extent with *Malus orientalis* Uglitz. in the Caucasus, and later on (~ 1500 YA), massively in Europe with *Malus sylvestris* (L.) Mill.⁴. *Malus sieversii* is therefore considered the progenitor of the cultivated apple while *M. sylvestris* is considered the second main contributor of apple genetic diversity through recent wild-to-crop introgressions⁵. Through introgression and phylogenetic closeness, *M. sieversii*, *M. orientalis*, and *M. sylvestris* are all considered CWR of cultivated apple. The need to assess their value as future sources for future breeding programs is urgent because these species are currently threatened by local crop-to-wild gene flow⁶⁻⁹.

The search for resistance on *M. domestica* wild relatives has been carried out mostly against pathogens, whereas studies describing resistance to pests are less frequent¹⁰. Among these, the *M. floribunda* Siebold clone 821 proved to be a major source of resistance genes to apple scab

Venturia inaequalis (Cooke) Winter¹¹, fire blight *Erwinia amylovora* Burrill¹² and the rosy apple aphid (RAA), *Dysaphis plantaginea* Passerini¹³. However, only a handful of studies have investigated resistance to pests and pathogens of CWR involved in the domestication of the apple. One study¹⁴ compared the levels of resistance against fire blight among 51 different genotypes of *M. sieversii* collected in Kazakhstan and Kyrgyzstan. Similarly the resistance of 194 *M. sieversii* accessions belonging to four distinct genetic groups¹⁵ was evaluated concurrently with nine different *M. domestica* cultivars¹⁶. Various fire blight resistance levels were observed among *M. sieversii* genetic clusters with two of them exhibiting the highest resistance levels among tested genotypes. Furthermore, a distinct resistance mechanism was revealed when several wild accessions were compared with cultivated apple cultivars using shoot inoculation in orchards. Specifically, fire blight infection rates were lower for several *M. sieversii* accessions but when successful, infection led to greater damage in these trees. Concerning resistance against insect pests, another study¹⁷ quantified the resistance of 19 *M. domestica* cultivars and two of its CWR, *M. sylvestris* and *M. kirghisorum*, to the florivorous apple blossom weevil, *Anthonomus pomorum* L.. The authors compared weevil resistance levels between the cultivated apple to the wild species. The species *M. sylvestris* and *M. kirghisorum* Al. Fed. & Fed. appeared to be more sensitive to *A. pomorum* but also supported a more abundant community of the weevil's natural enemies.

Among the pool of CRW apple species with putative benefits for cultivated apple breeding programs, *M. sylvestris* appears to be largely underexploited. For European apple production, *M. sylvestris* breeding presents several advantages including a shared local environment with *M. domestica*. Previous population genetic analyses of *M. sylvestris* populations using microsatellite markers revealed five genetic clusters spread throughout Scandinavia, Western Europe (mostly in France), Eastern Europe, Central Europe, and Italy^{6,7}. These five populations may possess adaptive alleles associated with specific environmental conditions or local parasites. However, responses to pathogens and pests among these wild apple genetic groups have yet to be explored.

The rosy apple aphid *D. plantaginea* (RAA) is the major aphid pest of the cultivated apple in Europe, Maghreb, and North America. This aphid species feeds on sap drawn from the phloem and develops at the apex of branches and/or on the most recently developed leaves. In addition to sap extraction, RAA saliva secretion provokes leaf-rolling and impairs shoot growth, greatly reducing yield¹⁸. Plant defenses against aphids include various strategies disrupting aphid preference, particularly through their host-plant colonization process¹⁹ that can be characterized by the potential success throughout six behavioral phases: (1) long- and short-range of host-plant perception, (2) plant contact and assessment of surface cues, (3) epidermal probing, (4) stylet pathway activity, (5) phloem penetration and salivation, and (6) phloem acceptance and ingestion. This colonization is finalized by entering a reproductive phase which can be characterized by fecundity and adult survival traits as aphid performance. In this study, a host plant was considered resistant to RAA from the moment it negatively impacted the preference and/or performance of the pest.

The current work explores the RAA behavior/physiology on a crop wild relative of the cultivated apple, taking into account intra-specific CWR population structure and level of crop-to-wild gene flow. This manuscript describes four research objectives: (1) An original sample collection was built from 42 wild apple plants grown from field-collected seeds derived from three of the five known *M. sylvestris* European populations⁷ and 14 cultivated apple plants derived from breeding crosses of *M. domestica* cultivars. (2) The 56 plants sampled were genetically characterized using 13 microsatellite markers⁴. Using population genetics inference, their genetic statuses were determined (i.e. belonging to the Western, Scandinavian and Eastern *M. sylvestris* populations, or to the *M. domestica* gene pool). The degree of crop-to-wild introgression was also assessed among these plants.

These genetically characterized plants were then used for behavioral and physiological assays that tested for putative RAA resistance in a CWR of *M. domestica*. (3) For each plant population identified, aphid preference was tested based on feeding behavior measured with the electropetrography (EPG) technique. (4) As a proxy for measuring fitness, adult fecundity, survival, and adult weight measures were used to determine aphid performance on each of the identified plant populations²⁰.

2. Materials and methods

2.1. Plant and insect materials

A total of 56 apple plants were grown from seeds and sampled for this study. Cultivated apple plants resulting from crosses between various cultivated apple varieties were used (*M. domestica*, referred to as “Dom”, N = 14, Table S1). The seeds were kindly provided by INRAE IRHS Angers that performed every year crosses for apple breeding programs. A total of 42 *M. sylvestris* plants were grown from field-collected seeds. These wild apple seeds originated from three out of the five known European wild apple populations (referred to as Danish: Syl_Dk, French: Syl_Fr and Romanian: Syl_Ro, N = 14 per population). Each population was represented by a single sampling site, and within each site, each seed was sampled on a single mother tree, so that each seedling has a different parental origin. Though *M. domestica* is usually grafted, new plants were grown from seed to eliminate the rootstock effect.

After field sampling, seeds were stored at -20 °C before vernalization for the experiment. Seeds were then vernalized for three months at 4 °C in the dark, then grown in controlled conditions for two months before being individually transferred to 3 L pots containing commercial sterilized potting soil. Potted plants were grown in a growth chamber for four weeks under the following conditions: 20 ± 1 °C, 75 ± 5% Relative Humidity (RH), and a 16:8 light:dark (L:D) photoperiod. The 56 plants were then genotyped using 13 previously published microsatellite markers (see below) to confirm their genetic status (i.e., belonging to one of the *M. sylvestris* European populations or crop-to-wild/wild-to-wild hybrid).

A single colony of *D. plantaginea* (Hemiptera: Aphididae) was used and provided by INRAE which were sampled as a population in spring 2018 from an apple tree at the Agrocampus Ouest orchard (Angers, France) (Philippe Robert, personal communication). This aphid population was mass reared without differentiating individual aphid clones on *M. domestica* cv. “Jonagold” plants obtained by in vitro multiplication²¹. Pots containing three plants (90 × 90 × 70 mm) were placed in a Plexiglas cube (50 cm). Mass rearing and experiments were performed in growth chambers under 20 ± 1 °C, 60 ± 5% RH, and a 16:8 L:D cycle.

Synchronized first instar nymphs were obtained by placing parthenogenetic adult females on plantlets for 24 h before removing them. They were then reared on *M. domestica* cv. “Jonagold” plants inside Plexiglas aerated boxes (36 × 24 × 14 cm) for ten days then used as the young adult RAA for the behavioral/performance experiments.

2.2. Apple population genetic diversity and structure

Genomic DNA was extracted with the NucleoSpin plant DNA extraction kit II (Macherey & Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer’s instructions. Microsatellites were amplified by multiplex PCR, with the Multiplex PCR Kit (QIAGEN, Inc.). We used 13 microsatellite markers, Ch01f02, Ch01f03, Ch01h01, Ch01h10, Ch02c06, Ch02c09, Ch02c11, Ch02d08, Ch03d07, Ch04c07, Ch05f06, GD12, and Hi02c07 in four multiplexes (MP01, MP02, MP03, MP04)⁴. PCR were performed in a final reaction volume of 15 ml (7.5 ml of QIAGEN Multiplex Master Mix, 10–20 mM of each primer, with the forward primer labelled with a fluorescent dye and 10 ng of template DNA) (See ⁴ for more details). The final volume was achieved with distilled water. A touch-down PCR program (initial annealing temperature of 60 °C, decreasing by 1 °C per cycle down to 55 °C) was used. Genotyping was performed on the GENTYANE platform (INRAE Clermont-Ferrand) using an ABI PRISM X3730XL, with 2 ml of GS500LIZ size standard (Applied Biosystems). Alleles were scored with GENEMAPPER 4.0 software (Applied Biosystems). Only multilocus genotypes with < 10% missing data were retained.

The genetic status of each seedling was assessed using the individual-based Bayesian clustering method implemented in STRUCTURE 2.3.3²². STRUCTURE makes use of Markov Chain Monte Carlo (MCMC) simulations to infer the proportion of ancestry of genotypes from K distinct clusters. The underlying algorithm attempts to minimize deviations from Hardy–Weinberg and linkage disequilibria. STRUCTURE was run from K = 1 to K = 8, ten independent runs were carried out for each K and 500,000 MCMC iterations were used after a burn-in of 50,000 steps. CLUMPAK (Greedy algorithm)²³ was used to look for distinct modes among the 10 replicated runs of each K. STRUCTURE analyses were run for the full dataset (N = 55, DNA could not be extracted from one Romanian seedling), and included as well 40 *M. domestica* genotypes as a reference for the cultivated apple gene pool⁶. We determined the strongest level of genetic structure using ΔK ²⁴, as implemented in the online post processing

software Structure Harvester²⁵. However, the K identified by this criterion often does not correspond to the finest biologically relevant population structure^{6,7,26,27}. A lack of consideration of intraspecies genetic structure in STRUCTURE analyses can bias the interpretation of introgression rates. We therefore visualized the bar plots and chose the K value for which all clusters had well assigned individuals while no further well-delimited and biogeographically relevant clusters could be identified for higher K values.

Once the best K chosen, wild plants assigned to the cultivated gene pool with a membership coefficient > 0.1 were classified as crop-to-wild hybrids (i.e., introgressed by *M. domestica*). Once crop-wild hybrids removed, plants assigned to a given wild gene pool with a cumulated membership coefficient > 0.9 were defined as “pure wild” individuals. Plants assigned to the wild gene pool with a cumulated membership coefficient < 0.9 to a given wild apple gene pool were defined as wild-wild-hybrids. The pure, crop-to-wild and wild-wild hybrids were included as factors in the statistical analyses. Pure seedlings were then assigned to a population (i.e., group of plants with a cumulated membership coefficient of up to 0.90 for a given wild apple cluster). Pure populations from the same geographic origin (i.e., Romania or France or Denmark) which showed (1) weak genetic differentiation with other wild populations (2) low number of individuals were merged. The “population” was then used as a factor for statistical analyses on physiological and behavioral assays. Population genetics statistics were estimated with Genodive²⁸ for each “pure” wild apple population including expected and observed heterozygosities, Weir and Cockerham F-statistics, Jost’s D, and deviations from Hardy–Weinberg equilibrium.

2.3. *Dysaphis plantaginea* feeding behavior

The feeding behavior of the RAA was investigated using the electrical penetration graph (EPG) method²⁹. Individual aphids were connected to the Giga-8 DC-EPG amplifier, each being placed on the abaxial side of a new growing leaf of an individual plant. The recordings were performed continuously for 8 h during the photophase inside a Faraday cage. Acquisition and analysis of the EPG waveforms were carried out using the PROBE 3.5 software (EPG Systems, www.epgsystems.eu). Parameters from the recorded waveforms were calculated with the EPG-Calc 6.1.7 software³⁰. They were based on different EPG waveforms³¹ corresponding to: (Pr) stylet activity within plant tissues; (C) stylet pathways in plant tissues except phloem and xylem; (E1) salivation in phloem elements; (E2) passive phloem sap ingestion; (G) active xylem sap ingestion; and (F) derailed stylet mechanics. A total of eight plants per *M. sylvestris* population (Syl_Dk, Syl_Fr, Syl_Ro) or *M. domestica* (Dom) genetic group were used for the EPG measurements. EPG records were obtained from 25 aphids for *M. domestica*, and from 27 aphids for each *M. sylvestris* population.

2.4. *Dysaphis plantaginea* performance

Two to three clip-cages were installed on 12 plants per genetic group identified in this study. Each cage contained an individual, synchronized aphid and was enclosed on a newly grown leaf. For each synchronized adult, observations were assessed every 24 h for 10 days. Survival (*i.e.*, the duration of adult survival over the period of 10 days) and daily fecundity (*i.e.*, the number of newly larviposited nymphs) were collected for 25 adults for *M. domestica*, and 28 to 29 adults for each of the three *M. sylvestris* populations.

To measure aphid weight, newly larviposited nymphs were enclosed for nine days in clip-cages on newly grown leaves similar to the above. For each plant genetic background, up to 20 aphids (*i.e.* young adults that had not larviposited yet) were then collected and stored in a freezer at -80°C . Each individual aphid was weighed using an electronic precision balance (Mettler M3, class 1, Max: 3 g Low: 1 μg , T = - 3G [dd] = 1 μg).

2.5. Statistical analyses

All statistical analyses were performed using the R software version 3.6.2 (The R Foundation, <https://www.r-project.org/>). Generalized linear models (GLM) with a likelihood ratio and Chi-square test were used to assess whether there was an effect of the host plant on aphid feeding behavior and performance. The apple tree genotype was included as the main factor. Data on daily aphid fecundity and some EPG parameters describing the number of occurrences of a particular phase (e.g. “n_E2”) were not normally distributed (count data), accordingly a GLM was carried out using respectively a quasi-Poisson and a Poisson distribution; a quasi-likelihood function was used to correct for over-dispersion, and Log was specified as the link function in the model. EPG data on feeding phase durations (e.g. duration of phloem sap ingestion “s_E2”) and aphid weight were not normally distributed, so a GLM using a Gamma (link = “inverse”) distribution was carried out. Analysis of the time before the first probe (“t.1Pr”) and before the first phloem sap ingestion (“t.1E2”) and adult survival has been carried out using the Cox proportional hazards (CPH) regression model, which is adapted to treat time-dependent parameters. Absence of an EPG reading were treated as missing values. The assumption of validity of proportional hazards was validated using the function “coxph” (package R: “survival”, version 3.1.8: <https://github.com/therneau/survival>). To assess whether the crop-to-wild hybrid status had a plant-mediated effect on RAA feeding behavior and performance, the same statistical tests were carried out with the hybrid statuses (*i.e.* “wild pure” or “wild-crop hybrid”) as the fixed factor while restricting the data set to the *M. sylvestris* populations only.

Finally, because of their close genetic relatedness, the Danish and French wild apples plants (Syl_Dk and Syl_Fr, respectively) were grouped together, as well as the *M. domestica* and the Romanian wild apple plants (Dom and Syl_Ro, respectively). A Monte-Carlo permutation test (999 replicates) was conducted to test for the significance of the differences of median of EPG phases duration, daily fecundity and weight between aphids submitted to these two host groups.

Analysis of the time before the first probe (“t.1Pr”) and before the first phloem sap ingestion (“t.1E2”) and adult survival has been carried out using the CPH regression model. The function “randtest” (package R: “ade4”: <https://cran.r-project.org/web/packages/ade4/ade4.pdf>) was run to access the significance of the observed differences.

The fit of all GLM was controlled by a visual evaluation of residuals and QQ plots. Concerning QQ plots, the distribution of the series were considered to follow the chosen theoretical law if the points of the graph were roughly aligned on a straight line. Any other structuring of the points (curvature(s), many distant points, *etc.*) indicated the opposite. GLM post-hoc comparisons were carried out by pairwise comparisons using estimated marginal means (package R: “emmeans”, <https://cran.r-project.org/web/packages/emmeans/emmeans.pdf>). Ethics approval. The article does not contain any studies with human participants or vertebrate animals.

3. Results

3.1. Population structure and detection of crop-wild and wild-wild hybrids

STRUCTURE analyses revealed a clear split between *M. domestica* and *M. sylvestris* seedlings for $K = 3$ (Supplementary Fig. S1). However, failing to take the population structure of the wild species into account can lead to spurious signals of introgression from crop species²⁶. We therefore analyzed the structure of *M. sylvestris* and identified that the Romanian, French, and Danish *M. sylvestris* seedlings formed distinct genetic clusters from each other for $K = 14$. For $K = 14$ the *M. domestica* seedlings used in the experiment grouped with the 40 reference *M. domestica* (Fig. 1 and Supplementary Fig. S1). The use of K values > 14 uncovered no further structure within *M. sylvestris*, indicating $K = 14$ captured $> 99\%$ of the genetic variance. STRUCTURE analysis detected eight clusters for *M. domestica* and six clusters for *M. sylvestris*. For $K = 14$, STRUCTURE revealed a clear partition between four discrete groups (Fig. 1 and Supplementary Fig. S1): (1) *M. domestica*, including *M. domestica* seedlings and the 40 reference samples, divided in eight admixed genetic groups, (2) the Romanian seedlings, divided into three genetic groups (orange, red, yellow), (3) the French seedlings divided into two genetic groups (dark and light blue, respectively), and (4) the Danish seedlings formed a single distinct genetic group (green). Note that the French and Danish samples only split from $K = 11$. This weak genetic structure was further validated by the relatively low F_{ST} and Jost’s D values among those two groups ($F_{ST} = 0.08$, $P < 0.01$, Table S2). We therefore used cumulative membership coefficient of each seedling in the six *M. sylvestris* or the eight *M. domestica* genetic groups in subsequent analyses to identify crop-to-wild and wild-wild hybrid genotypes.

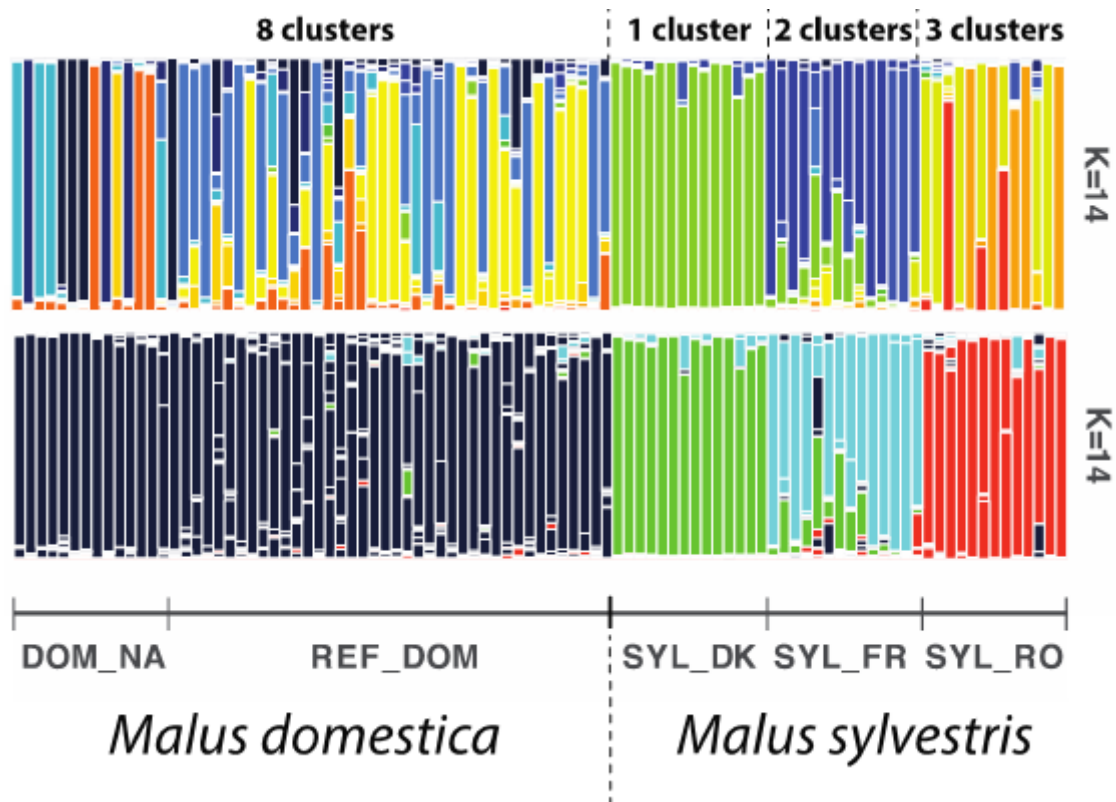


FIGURE 1 Assessment of the genetic status of the wild and cultivated apple seedlings (*Malus sylvestris* and *Malus domestica*, respectively) used in this study. Upper barplot: Population structure inferred with STRUCTURE for $K = 14$ for the Romanian, French, Danish *M. sylvestris* seedlings, and the *M. domestica* seedlings. STRUCTURE detected eight cultivated gene pools, including the 40 *M. domestica* reference cultivars (DOM_REF, 40 reference *M. domestica*) and the cultivated apple seedling used in this study (DOM_NA, $N = 14$). The Romanian seedlings (SYL_RO, $N = 13$) clustered into three clusters (orange, red and yellow colors), the French seedlings (SYL_FR, $N = 14$) into two clusters (light and dark blue color), and the Danish seedlings (SYL_DK, $N = 14$) into one cluster (green color). Lower barplot: For the sake of visualization the eight cultivated gene pools were coloured in dark blue (lower barplot), the three Romanian clusters in red, the two French clusters in light blue, and the Danish stayed light green.

For the 41 seedlings identified a priori as *M. sylvestris*, four genotypes (three French seedlings and one Romanian seedling, 9.7% of the *M. sylvestris* seedlings) showed signs of introgression from *M. domestica* (i.e., cumulative membership coefficients > 0.1 into the cumulated *M. domestica* gene pool, Supplementary Table S1). A total of four wild-wild hybrids were detected (i.e., individuals with cumulative membership coefficients into the three French genepools < 0.9 , Supplementary Table S1), including three French-Danish, and one Romanian-French hybrids. Genetic diversity estimates for each population, and genetic differentiation estimates among populations (excluding crop-wild and wild-wild hybrids) are provided in Tables S1 and S2. Note that, once the hybrids were removed, the Romanian wild apple population (FR_RO)

was the genetically closest wild apple population to the cultivated apple (i.e. DOM_REF and DOM_NA, $F_{ST}(\text{REF_DOM-SYL_RO}) = 0.09$ and $F_{ST}(\text{REF_NA-SYL_RO}) = 0.11$, respectively, $P < 0.001$), and the Danish and French wild apple populations were still the most genetically closely related, followed by the Romanian and the French wild apple populations (Supplementary Table S2).

3.2. Effect of the host apple species and population on *Dysaphis plantaginea* feeding behavior

Feeding phases and associated analytical results are described in Table 1 for aphids reared on *M. domestica* and trees of each *M. sylvestris* population. Concerning general probing (Pr, parameters 1–3), the total duration of stylet activity in the plants (Pr, parameter 2) lasted on average about 6 h (out of 8 recorded hours) and was not significantly different among aphids, whatever the genetic background of their host plant (GLM using Gamma distribution: $\chi^2 = 0.60$, Df = 3, $P = 0.60$). This global activity was composed of an average of 13 probing events (Pr, parameter 3), again without any significant difference between aphids on the host plants with different genetic background (GLM using Poisson distribution: $\chi^2 = 0.14$, Df = 3, $P = 0.14$). This is despite the fact that the mean number of probes tended to be smaller on *M. domestica* host plants. Similarly, there was no significant difference between the time to first probe (Pr, parameter 1) (CPH: $\chi^2 = 1.49$, Df = 3, $P = 0.68$). The pathway phase (C, parameters 4 and 5) comprised on average of 60% of the total activity. There was no significant difference for its total duration (C, parameter 4) (GLM using Gamma distribution: $\chi^2 = 3.13$, Df = 3, $P = 0.37$) or for the number of occurrence (C, parameter 5) (GLM using Poisson distribution: $\chi^2 = 5.49$, Df = 3, $P = 0.14$).

TABLE 1 Feeding phases (mean \pm standard error of the mean) of *Dysaphis plantaginea* feeding on plants belonging to the three *Malus sylvestris* populations (i.e., Danish, French and Romanian, hereafter referred to as “Syl_Dk”, “Syl_Fr”, “Syl_Ro”, respectively) and to the *Malus domestica* genepool (“Dom”).

EPG classes	P value	<i>Dom</i>	<i>Syl_Dk</i>	<i>Syl_Fr</i>	<i>Syl_Ro</i>
General probing behavior and pathway phase		(n=25)	(n=27)	(n=27)	(n=27)
1. Time to first probe (min)	0.68 (NS)	20.7 \pm 6.5	22.8 \pm 7.0	14.7 \pm 2.6	25.9 \pm 6.1
2. Total duration of probing (Pr) (min)	0.60 (NS)	374.7 \pm 12.6	361.5 \pm 10.83	377.6 \pm 11.3	359.9 \pm 11.1
3. Number of probes (Pr)	0.14 (NS)	11.4 \pm 1.3	13.0 \pm 2.0	12.8 \pm 1.5	13.7 \pm 1.4
4. Total duration of pathway phase (C) (min)	0.37 (NS)	218.1 \pm 17.1	250.3 \pm 11.5	228.9 \pm 12.5	217.3 \pm 16.8
5. Number of pathway phases (C)	0.14 (NS)	16.3 \pm 1.4	19.0 \pm 2.0	17.6 \pm 1.4	18.2 \pm 1.3
Phloem phase		(n=21)	(n=22)	(n=20)	(n=20)
6. Total duration of phloem salivation (E1) (min)	<0.001 (***)	9.1 \pm 1.6 a	3.0 \pm 0.6 b	2.6 \pm 0.5 b	8.3 \pm 1.6 a
7. Number of phloem salivation (E1)	<0.001 (***)	4.8 \pm 0.8 a	3.2 \pm 0.5 bc	2.5 \pm 0.5 c	4.0 \pm 0.7 ab
		(n=19)	(n=20)	(n=18)	(n=19)
8. Time to first phloem ingestion (E2) (min)	0.48 (NS)	174.4 \pm 25.1	230.56 \pm 28.6	253.9 \pm 30.2	184.0 \pm 20.9
9. Total duration of phloem sap ingestion (E2) (min)	0.008 (**)	91.4 \pm 18.7 a	32.25 \pm 7.4 b	71.2 \pm 19.2 ab	86.8 \pm 18.0 a
10. Number of phloem ingestion (E2)	0.006 (**)	3.2 \pm 0.6 a	2.37 \pm 0.4 ab	2.0 \pm 0.4 b	3.2 \pm 0.6 a
Other phases		(n=5)	(n=0)	(n=2)	(n=2)
11. Total duration of xylem ingestion (G) (min)	-	134.9 \pm 52.9	-	50.0 \pm 24.7	39.1 \pm 12.6
		(n=13)	(n=14)	(n=10)	(n=12)
12. Total duration of stylet derailment (F) (min)	0.59 (NS)	82.8 \pm 13.2	93.3 \pm 10.1	108.7 \pm 19.9	109.4 \pm 23.3

The letters within a row indicate significant differences associated with pairwise comparisons using estimated marginal means. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 associated with GLM models (using respectively Poisson and Gamma distribution for the number and total duration of feeding phases) or Cox models (for “time to first phase”) (degree of freedom = 3 for each test).

Concerning the phloemian phase (parameters 6–10), most parameters revealed differences among aphids fed on trees belonging to the three wild apple populations and the cultivated gene pool. The mean duration of salivation within phloem was significantly shorter for aphids submitted to French and Danish *M. sylvestris* plants compared with aphids submitted to *M. domestica* and Romanian *M. sylvestris* plants (E1, parameter 6) (GLM using Gamma distribution: $\chi^2 = 35.02$, Df = 3, P < 0.001). Aphids fed on Danish and French *M. sylvestris* plants salivated three times less compared to aphids fed on *M. domestica* and Romanian *M. sylvestris* plants. Aphids submitted to French and Danish *M. sylvestris* plants displayed a smaller number of salivations within phloem compared to aphids on *M. domestica* whereas aphids submitted to French *M. sylvestris* plants had a significantly shorter number of salivations within phloem compared to those on Romanian *M. sylvestris* plants (E1, parameter 7) (GLM using Poisson distribution: $\chi^2 = 21.55$, Df = 3, P < 0.001). The mean duration of phloem ingestion (E2, parameter 9) was significantly shorter for aphids on the Danish *M. sylvestris* compared to aphids on *M. domestica* and the Romanian *M. sylvestris* plants (GLM using Gamma distribution: $\chi^2 = 12.50$, Df = 3, P = 0.08). The mean proportion of the time dedicated to phloem ingestion (E2) was variable depending on the host plant genetic background: from 9% (Syl_Dk) to 24% (Syl_Ro/Dom) within the general probing activity. The number of phloem ingestion (E2, parameter 10) was significantly smaller for aphids submitted to the French *M. sylvestris* compared to those submitted to *M. domestica* and the Romanian *M. sylvestris* plants (GLM using Poisson distribution: $\chi^2 = 11.89$, Df = 3, P = 0.06).

Finally, the duration of the time needed by an aphid to reach the phloem (E2, parameter 8) tended to be shorter on *M. domestica* or Romanian *M. sylvestris* plants (around 3 h) than on Danish and French *M. sylvestris* plants (around 4 h), though no significant difference was observed (CPH: $\chi^2 = 2.48$, Df = 3, P = 0.48). Considering xylem ingestion (G, parameter 11) aphids submitted to Danish *M. sylvestris* plants did not ingest raw sap, whereas a few aphids ingested xylem on the French and Romanian *M. sylvestris* plants. Altogether, not enough aphids displayed this behavior to conduct statistical analysis. Almost half of the aphids presented stylet derailment (F, parameter 12) for an average total duration of roughly 1.5 h, that was not statistically different between the different host plant genetic backgrounds (GLM using Gamma distribution: $\chi^2 = 0.59$, Df = 3, P = 0.59).

Considering the genetic proximity of the Danish and French *M. sylvestris* populations (Table S2), as well as the genetic proximity of the Romanian *M. sylvestris* and *M. domestica*, the two-by-two pairing of datasets (*i.e.*, Syl_Dk/Syl_Fr vs Dom/Syl_Ro) revealed that the total duration of phloem salivation (Monte-Carlo permutation test, P = 0.001) and the total duration of phloem sap ingestion (Monte-Carlo permutation test, P = 0.016) were significantly longer for the Dom/Syl_Ro pair. Regardless *M. sylvestris* populations, the duration of phloem sap ingestion phase was significantly affected by the host plant hybrid status and was shorter for hybrids compared to pure *M. sylvestris* (GLM using Gamma distribution: $\chi^2 = 4.23$, Df = 1, P = 0.04).

3.3. Effect of the host plant population on *Dysaphis plantaginea* fitness parameters

The impact of host plant genetic background on RAA fitness and associated statistical analyses are presented in Table 2. There was no significant difference for daily fecundities (GLM using quasi-Poisson distribution: $\chi^2 = 1.49$, Df = 3, $P > 0.05$) between aphids raised on the four plant genetic backgrounds. Similarly, there was no significant difference for survival (CPH: $\chi^2 = 3.39$, Df = 3, $P > 0.05$). Aphid weight was significantly impacted by the plant genetic background: the weight of aphids raised on *M. domestica* was significantly greater (GLM using Gamma distribution: $\chi^2 = 8.10$, Df = 3, $P < 0.05$) than that of aphids raised on the Danish *M. sylvestris* plants. Again taking into consideration the genetic proximity between the Danish and French *M. sylvestris* as well as the Romanian *M. sylvestris* and *M. domestica*, the two-by-two pairing of datasets (Syl_Dk/Syl_Fr vs Dom/Syl_Ro) revealed no significant difference for all fitness parameters. Regardless *M. sylvestris* population, aphid weight was significantly affected by the host-plant hybrid status: aphids raised on hybrids displayed smaller weights compared to those on pure *M. sylvestris* (GLM using Gamma distribution: $\chi^2 = 5.16$, Df = 1, $P = 0.02$), whereas neither fecundity nor survival were impacted.

TABLE 2 Fitness parameters (mean \pm standard error of the mean) for *Dysaphis plantaginea* reared on plants belonging to three *Malus sylvestris* populations (Danish, French and Romanian, i.e. hereafter referred as to “Syl_Dk”, “Syl_Fr”, “Syl_Ro”, respectively) and to the *Malus domestica* genepool (“Dom”).

Parameters	GLM/Cox	<i>Dom</i>	<i>Syl_Dk</i>	<i>Syl_Fr</i>	<i>Syl_Ro</i>
	models P value	<i>n</i> =25	<i>n</i> =28	<i>n</i> =29	<i>n</i> =28
Daily fecundity	0.69 (NS)	2.33 \pm 0.26	2.46 \pm 0.26	2.38 \pm 0.22	2.08 \pm 0.22
Survival (days)	0.34 (NS)	9.20 \pm 0.34	9.75 \pm 0.14	9.28 \pm 0.39	9.50 \pm 0.31
		<i>n</i> =56	<i>n</i> =73	<i>n</i> =80	<i>n</i> =80
Aphid weight (μ g)	0.043 (*)	557.88 \pm 39.05	427.92 \pm 28.54	476.30 \pm 22.84	490.26 \pm 32.20
		a	b	ab	ab

The letters within a row indicate significant differences associated with pairwise comparisons using estimated marginal means. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ associated with GLM models (using respectively a quasi-Poisson for daily fecundity and Gamma distribution aphid weight) or Cox models (for survival) (degree of freedom = 3 for each test).

4. Discussion

This is the first study reporting differences in phytophagous pest preference that are congruent with the genetic relationship between a wild relative and a cultivated plant with which it has introgressed. Population genetic analyses also revealed weak genetic differentiation between the Danish and French *M. sylvestris* wild apple populations. Accordingly, behavioral assays of aphids submitted to plants from these two populations showed similar patterns suggesting antixenosis resistance³². Likewise, the Romanian *M. sylvestris* host population was strongly differentiated from *M. domestica* but was also the most closely genetically related to the wild apple population. Consistent with this observation, the Romanian wild apple population and *M. domestica* showed comparable levels of sensitivity to RAA. Crop-to-wild introgression appeared to drive resistance to RAA independent of population genetic structure.

This study revealed a putative link between aphid preference and the genetic structure among wild and cultivated apple populations. The population structure inferred here stingingly matched the one previously observed for the European wild apple^{7,33}, with five main populations in Europe of which, an Eastern, a French and a Scandinavian. We showed that the French and Danish populations were the genetically closest and sharing the highest number of wild-wild hybrids. Accordingly, we can note that aphids showed similar patterns of feeding behavior and performance when submitted to the two most closely related wild apple populations (the Danish and French populations). When aphids were subjected to the Romanian wild apple population and the cultivated apple, similar patterns of aphid behavior and performance were recorded and were associated with higher preference for the Romanian host-plant than aphids submitted to the Danish and French populations. Aphid behavior was actually congruent with the level of genetic differentiation between the Romanian wild apple and the cultivated apple. Once the recent crop-to-wild hybrids were removed, the Romanian population appeared to be the closest wild apple relative to cultivated *M. domestica*. Genetic proximity of populations is known to drive patterns of resistance against pathogens in the wild apple *M. sieversii*^{15,16}. Previous studies revealed variable resistance against pests and pathogens among *M. domestica* CWR^{14,16}. In this study, the genetic differentiation between the two paired groups (Syl_Dk/Syl_Fr vs Dom/Syl_Ro) might be associated with a phenotypic differentiation associated with the differences observed in terms of RAA feeding behavior. The genetic proximity of the French/Danish and Romanian/cultivated apple may reflect common evolutionary history, however further investigations are required concerning the evolutionary history of the cultivated apple in Europe. In particular, the relative contributions of each wild apple population, especially the Romanian, to the cultivated apple gene pool remains unknown. Addressing this issue would require much larger sampling among European apple seeds.

Not considering genetic proximity among populations, but only population structure, behavioral analyses with EPG demonstrated a generalized activity for the rosy apple aphid, which did not depend on the genetic background of the host plant. Our results showed that whatever the plant genetic background, the time to first probe was not delayed, meaning that

the possible influence of epidermal barriers and/or putative plant volatile organic compound (VOC) repulsive effects could be excluded; VOC on leaf surface could indeed impact aphids behavior¹⁹. A delayed aphid stylet activity is considered to be due to epidermic factors, as the second phase of host selection involves the assessment of plant surface cues by the aphid. Features such as a thick cuticle or the presence of trichomes are physical parameters that may play a role in aphid resistance³⁴. Stylet derailment was displayed on every plant genetic background in the same range of mean duration and the pathway phase was not influenced by the plant genetic background. This means that putative mild physicochemical resistance is present of mesophyll tissues in both wild and cultivated apple. In contrast with the above, significant differences were observed between the four plant genetic backgrounds in phloem-related behavior. The phloemian activity was significantly reduced in terms of the duration of both salivation and ingestion for aphids submitted to the Danish and French *M. sylvestris* populations. Since the average time to reach the phloem was not significantly different between the four plant genetic backgrounds, these differences did not appear to be linked to physical characteristics but due to the phloem chemical composition. Comparison of ascorbic acid glycoside (AAG) content in *M. domestica*, *M. sylvestris* and *M. sieversii* apple fruits revealed that accessions of *M. sylvestris* were distinguished by higher concentrations of AAG³⁵. A difference in terms of phenolic compounds among *M. sylvestris* populations could be a possible factor explaining the contrasted phloemian activities observed. In fact, phenolic profile of various *M. domestica* cultivars apple fruits can be linked to field RAA resistance³⁶. Further studies involving choice assays towards the four genetic backgrounds should provide a better understanding of RAA preference, and especially of long and short range host-plant perception. Despite the differences recorded in the feeding behavior, no differences were observed in two of the three RAA fitness parameters (survival and fecundity) regardless of host-plant genetic background. As high proportions of aphids could initiate reproduction before accessing the phloem³⁷, the results concerning fecundity may be consistent with the absence of significant differences in pathway phase parameters. Aphid biomass assays revealed that only aphids submitted to the cultivated apple tree had greater weights than those submitted to the Danish *M. sylvestris*. This is consistent with the fact that the shortest sap ingestion was observed for aphids submitted to the Danish *M. sylvestris*, whereas aphids reared on *M. domestica* exhibited the longest sap ingestion. Sap ingestion is known to be positively correlated with growth³⁸, thus the contrasted preference of RAA was not reflected in RAA performance, except for adult weight.

For the first time, our study also shed light on the impact of domestic introgression in *M. sylvestris* on RAA preference and performance. Previous studies already detected substantial crop-to-wild gene flow in apple trees in Europe^{7,8}. Here, we confirmed the occurrence of ongoing crop-to-wild gene flow for the European wild apple. We detected 11% of crop-to-wild hybrids in our dataset, which is half less than previous estimates (23%)⁷. Several reasons can explain this discrepancy, including the narrow spatial geographic area investigated here (four locations *versus* 62 locations previously) and the lower number of samples used (here 42 vs

1889 *M. sylvestris* trees previously). Note however that the aim of our study was not to investigate the large-scale crop-wild gene flow in *M. sylvestris* but assessing the genetic status of the seedlings used for aphid physiological and behavioral assays to control this effect in the statistical models. Yet, in comparison to previous studies, the detection of crop-wild hybrids in seeds collected in 2016–2017 are proof that recent ongoing crop-to-wild gene flows are still at work in apples, especially in the French populations. Indeed, previous studies rather investigated historical crop-to-wild gene flow as they did not sample seeds but much older mother trees. It is also interesting to note that we detected a clear effect of the hybrid status on RAA preference, in terms of phloem sap ingestion, and on RAA performance, in terms of aphid weight. Our bioassays on aphids revealed that pure *M. sylvestris* were more suitable hosts to RAA than crop-to-wild hybrids. A previous study revealed that crop-to-wild hybrids showed higher plant growth and pollination rates compared to pure wild apples⁸. Here our results would suggest that higher fitness of crop-to-wild hybrids is not only expressed for early developmental traits but is also associated with higher resistance abilities to RAA attacks. However, this question would require further investigation.

Finally, it is worth questioning to what extent *Malus sylvestris* could represent a putative genetic source of resistance for *Malus domestica* breeding programs. The *M. domestica* genetic group studied here could be considered as susceptible when compared with the resistance/susceptibility of *M. domestica* to RAA demonstrated by a previous study also using EPG³⁹. Regarding general probing activity and phloemian phases, the mean values of electropetrography parameters obtained here for aphids submitted to the *M. domestica* genetic group appeared to be close to values obtained on a susceptible cultivar (*M. domestica* cv. Golden Delicious) in comparison to a resistant one (*M. domestica* cv. Florina)³⁹. The latter has been identified as strongly resistant to the RAA in numerous studies^{13,40–42}. In our study, we observed a gradient of resistance to the RAA for the European wild apple, but less marked than for *M. domestica*. Among *M. domestica* cultivars, resistant cultivars impacted RAA preference through both epidermic and phloemian factors³⁹. Indeed, compared to that of aphids on susceptible controls, the feeding behavior of aphids on the resistant Florina cultivar revealed shorter durations for general probing (Pr), phloem salivation phase (E1), xylem sap ingestion (G). Also, none of the aphids ingested phloem sap (*i.e.* the E2 phase was null) and a significantly longer total duration of stylets derailment was observed when submitted to this resistant cultivar. In our case, *M. sylvestris* did only impact RAA preference through the phloemian phase, with most individuals able to ingest sap, although lasting for short duration. Therefore, RAA preference in the European wild apple studied here only involved one factor, the phloemian phase, in contrast to what was previously observed among *M. domestica* cultivars. Besides, the two-factor aphid response on the *M. domestica* host is also associated with lower RAA performance^{13,40–42}. Strikingly, our study showed that only the Danish *M. sylvestris* population negatively impacted both RAA preference and performance compared to *M. domestica*. Thus, the Danish *M. sylvestris* population may be more resistant against RAA than *M. domestica* and would appear to represent a potential source of resistance for *M. domestica*

breeding programs, although this CRW candidate did not impact RAA fecundity or survival. However, our results are consistent with previous investigations of pests and pathogens resistance in *Malus domestica* CWR which were involved in its domestication, in which some wild accessions were as sensitive as the cultivated ones^{16,17}. Resistance against the pest of CWR would be mainly indirect, as they support greater communities of natural enemies¹⁷. Thus, as we did not proceed to field validation of our results, we may have overlooked some components of CWR resistance. Investigating RAA performance for several aphid generations would also be worth carrying out on the Danish *M. sylvestris* population, as this host negatively impacted aphid behavior and fitness in terms of weight and these negative effects may have a greater impact over generations. A greater diversity of new resistance genes or alleles against RAA may be present in CWR gene pool involved in the apple domestication. CWR are however largely neglected when it comes to studying their resistance to RAA. To better understand resistance differences at an interspecific level, more CWR species have to be included in experiments, such as *M. orientalis* and *M. sieversii*. However, this would involve exposing RAA to apple CWRs that are absent in its natural environment. Future studies may also investigate cross infestations of aphid populations from different parts of Europe onto CWR populations to truly test for RAA local adaptation. To test for the influence of maternal priming, it would also be interesting to compare relative preferences among the aphids reared on *M. domestica* to the relative preference among aphids reared on *M. sylvestris*.

To conclude, this work tested for the first time preferences and survival of a main pest of apple trees, among genetically distinct groups including wild and cultivated host plants. Identification of resistance adaptations among wild genotypes may help design strategies to improve *M. domestica* plant productivity. But above all, the present study reveals that the search for resistant CWR must not only be based on a genetic structure of wild populations but also on the crop-to-wild gene flow that appears to substantially drive resistance to RAA. In that sense French wild apples, which showed high level of crop-to-wild gene flow, may be good candidates for future breeding programs.

Acknowledgments

This work was supported by Project PROVERBIO (Protection of orchards by biological control: an adapted selection of auxiliaries) financed by the European Union, under the scope of the FEDER program and INTERREG initiative: Programme 2014–2020 INTERREG V-A Belgium—France (France—Wallonie—Vlaanderen), and the ATIP-Avenir CNRS-Inserm program. We thank Philippe Robert (INRAE Agrocampus Ouest, Angers, France) for providing the population of *Dysaphis plantaginea*. Yvelise Fourdrain is thanked for her help in plant cultures and aphid mass rearing. Françoise Dubois is thanked for her technical assistance. We thank Marie-Pierre Boley for her help with the administrative tasks. Carine Remoué, Agnès Rousselet, and Matthieu Falque are thanked for their contribution in DNA plant extraction and microsatellite plant genotyping. We thank the INRAE GENTYANE platform for SSR

genotyping (Clermont Ferrand), and its group leader Charles Poncet. Quentin Chesnais and Pedro Poli are thanked for their assistance in the statistical analysis of the data.

Author contributions

Conceived and designed the experiments: A.C. X.C. A.A. G.D. T.D. Performed the experiments: A.C. X.C. T.D. Analyzed the data: A.C. X.C. T.D. Wrote the paper: A.C. X.C. A.A. G.D. T.D. T.H.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Supplementary Material

SUPPLEMENTARY FIGURE 1 Population structure of *Malus domestica* and Danish, French and Romanian *Malus sylvestris* seedlings

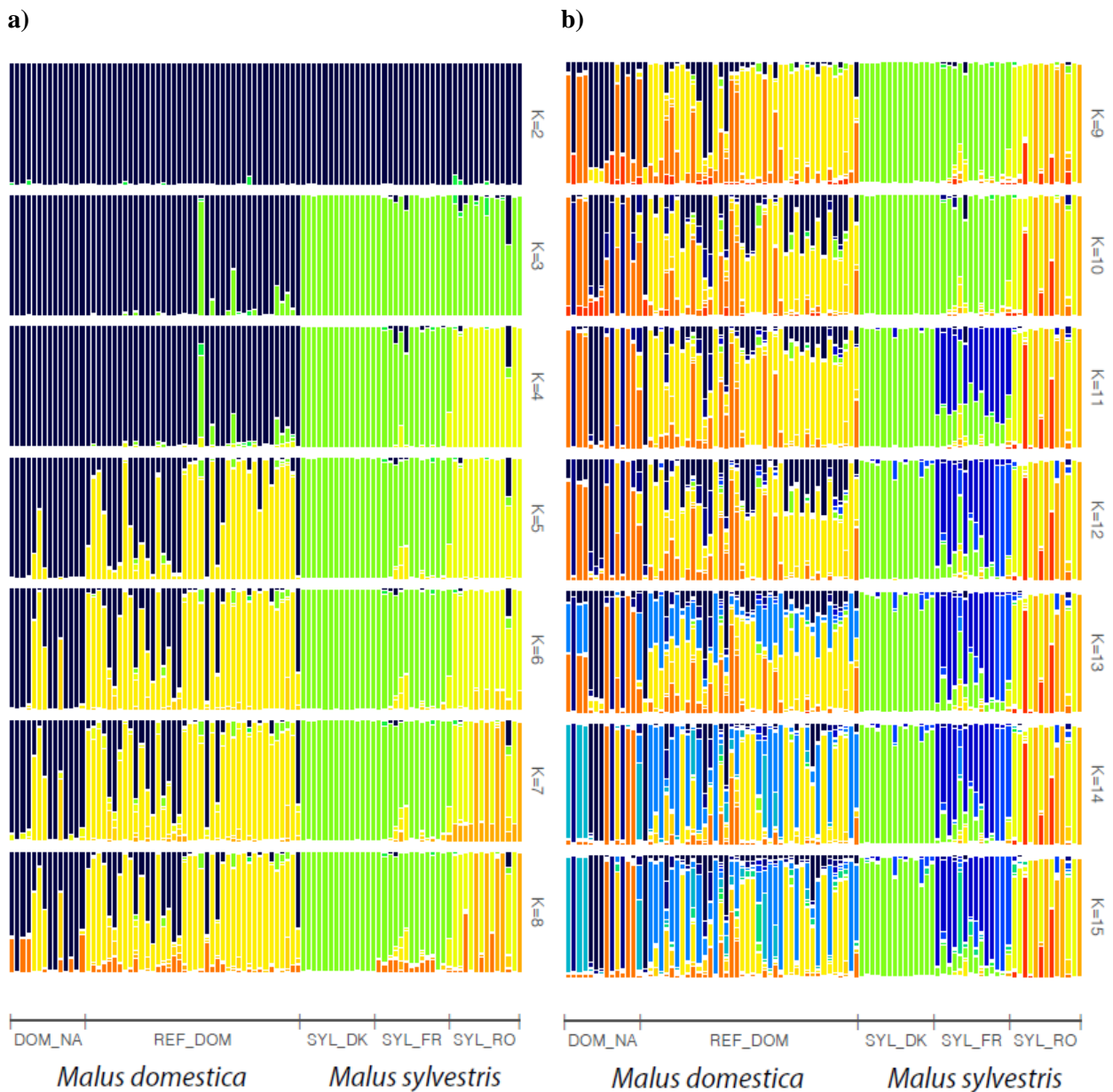


FIGURE S1 Population structure inferred with STRUCTURE for the Romanian (SYL_RO, $N=13$, one sample could not be genotyped), the French (SYL_FR, $N=14$), the Danish (SYL_DK, $N=14$) *Malus sylvestris* seedlings (green, light blue, yellow, orange colors) and the cultivated *Malus domestica* (dark blue) (DOM_NA, $N=14$, and, REF_DOM, 40 reference *M. domestica*) for a) $K=2$ to $K=8$ and for b) $K=9$ to $K=15$.

TABLE S1 Genetic diversity estimates for the three *Malus sylvestris* populations (i.e. individuals assigned to the population with a cumulative membership coefficient of >0.9 to the clusters detected for a group of seedlings from the same geographic origin, i.e. DK, FR, RO) detected with STRUCTURE for $K=14$ (SYL_RO, $N=11$, SYL_DK, $N=12$, SYL_FR, $N=11$) and the cultivated *Malus domestica* (DOM_NA, $N = 14$, and, REF_DOM, 40 reference *M. domestica*). *: $0.05 < P\text{-value} < 0.01$; **: $P\text{-value} < 0.001$

Population	Cluster	N	H_O	H_E	F_{IS}
DOM_NA	8 clusters	15	0.737	0.779	0.05
REF_DOM		40	0.813	0.784	-0.04
SYL_DK	1 cluster (green)	12 (2 DK-FR hybrids removed)	0.820	0.801	-0.03
SYL_FR	2 clusters (dark and light blue)	7 (6 samples removed: 3 crop-wild hybrids, and 4 FR-DK wild-wild hybrids)	0.578	0.646	0.11**
SYL_RO	3 clusters (orange, red and yellow)	11 (2 samples removed: 1 crop-wild hybrids, and 1 RO-FR wild-wild hybrid)	0.767	0.784	0.02

N =Number of individuals; H_O : observed heterozygosity; H_E : expected heterozygosity, F_{IS} , inbreeding coefficient, bold values: $P\text{-values} < 0.001$, cluster: cluster(s) detected and used to cumulate membership coefficients for $K=14$ and sort the crop-to-wild hybrids and wild-wild hybrids, total, $N=5$ individuals were removed from the initial dataset (ID).

TABLE S2 Pairwise F_{ST} (lower diagonal) and Jost's D (upper diagonal) among the three populations (i.e., cluster inferred with STRUCTURE including plants with a membership coefficient of up to 0.90 for the focal cluster, SYL_RO, $N=11$, SYL_DK, $N=2$, SYL_FR, $N=7$) and the cultivated *Malus domestica* (DOM_NA, $N = 8$, and, REF_DOM, 40 reference *M. domestica*). All values were significant.

	DOM_NA	REF_DOM	SYL_DA	SYL_FR	SYL_RO
DOM_NA	0.000	0.18	0.70	0.57	0.60
REF_DOM	0.05	0.000	0.68	0.60	0.52
SYL_DA	0.22	0.20	0.000	0.22	0.64
SYL_FR	0.14	0.13	0.08	0.000	0.50
SYL_RO	0.11	0.09	0.17	0.09	0.000

References

1. Lechenet, M., Dessaint, F., Py, G., Makowski, D. & Munier-Jolain, N. Reducing pesticide use while preserving crop productivity and profitability on arable farms. *Nat. Plants* 3, 1–6 (2017).
2. Zhang, H., Mittal, N., Leamy, L. J., Barazani, O. & Song, B.-H. Back into the wild—apply untapped genetic diversity of wild relatives for crop improvement. *Evol. Appl.* 10, 5–24 (2017).
3. Hodgkin, T. & Hajjar, R. Using crop wild relatives for crop improvement: trends and perspectives. In *Crop Wild Relative Conservation and Use* (eds Maxted, N. *et al.*) 535–548 (CABI, 2007).
4. Cornille, A. *et al.* New insight into the history of domesticated apple: secondary contribution of the European wild apple to the genome of cultivated varieties. *PLOS Genet.* 8, e1002703 (2012).
5. Cornille, A. *et al.* A multifaceted overview of apple tree domestication. *Trends Plant Sci.* 24, 770–782 (2019).
6. Cornille, A., Gladieux, P. & Giraud, T. Crop-to-wild gene flow and spatial genetic structure in the closest wild relatives of the cultivated apple. *Evol. Appl.* 6, 737–748 (2013).
7. Cornille, A. *et al.* Anthropogenic and natural drivers of gene flow in a temperate wild fruit tree: a basis for conservation and breeding programs in apples. *Evol. Appl.* 8, 373–384 (2015).
8. Feurtey, A., Cornille, A., Shykoff, J. A., Snirc, A. & Giraud, T. Crop-to-wild gene flow and its fitness consequences for a wild fruit tree: towards a comprehensive conservation strategy of the wild apple in Europe. *Evol. Appl.* 10, 180–188 (2017).
9. Ruhsam, M., Jessop, W., Cornille, A., Renny, J. & Worrell, R. Crop-to-wild introgression in the European wild apple *Malus sylvestris* in Northern Britain. *For. Int. J. For. Res.* 92, 85–96 (2018).
10. Keller-Przybyłkiewicz, S. & Korbin, M. U. The history of mapping the apple genome. *Folia Hort.* 25(2), 161–168 (2013).
11. Dunemann, F., Kahnau, R. & Schmidt, H. Genetic relationships in *Malus* evaluated by RAPD ‘fingerprinting’ of cultivars and wild species. *Plant Breed.* 113, 150–159 (1994).
12. Durel, C.-E., Denancé, C. & Brisset, M.-N. Two distinct major QTL for resistance to fire blight co-localize on linkage group 12 in apple genotypes ‘Evereste’ and *Malus floribunda* clone 821. *Genome* 52, 139–147 (2009).
13. Dall’Agata, M. *et al.* Identification of candidate genes at the *Dp-fl* locus conferring resistance against the rosy apple aphid *Dysaphis plantaginea*. *Tree Genet. Genom.* 14, 12 (2018).
14. Luby, J. J., Alspach, P. A., Bus, V. G. M. & Oraguzie, N. C. Field resistance to fire blight in a diverse apple (*Malus sp.*) germplasm collection. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 127, 245–253 (2002).
15. Richards, C. M. *et al.* Genetic diversity and population structure in *Malus sieversii*, a wild progenitor species of domesticated apple. *Tree Genet. Genom.* 5, 339–347 (2009).
16. Harshman, J. M. *et al.* Fire blight resistance in wild accessions of *Malus sieversii*. *Plant Dis.* 101, 1738–1745 (2017).

17. Knuff, A. K., Obermaier, E. & Mody, K. Differential susceptibility and suitability of domestic and wild apple species for a florivorous weevil and its parasitoids. *J. Appl. Entomol.* 141, 285–299 (2017).
18. Qubbaj, T., Reineke, A. & Zebitz, C. P. W. Molecular interactions between rosy apple aphids, *Dysaphis plantaginea*, and resistant and susceptible cultivars of its primary host *Malus domestica*. *Entomol. Exp. Appl.* 115, 145–152 (2005).
19. Powell, G., Tosh, C. R. & Hardie, J. Host plant selection by aphids: behavioral, evolutionary, and applied perspectives. *Annu. Rev. Entomol.* 51, 309–330 (2006).
20. Beukeboom, L. W. Size matters in insects—an introduction. *Entomol. Exp. Appl.* 166, 2–3 (2018).
21. Druart, P. Optimization of culture media for in vitro rooting of *Malus domestica* Borkh. cv. compact Spartan. *Biol. Plant.* 39, 67–77 (1997).
22. Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donnelly, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959 (2000).
23. Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. A. & Mayrose, I. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Mol. Ecol. Resour.* 15, 1179–1191 (2015).
24. Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14, 2611–2620 (2005).
25. Earl, D. A. & von Holdt, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 4, 359–361 (2012).
26. Kalinowski, S. T. The computer program STRUCTURE does not reliably identify the main genetic clusters within species: simulations and implications for human population structure. *Heredity* 106, 625–632 (2011).
27. Puechmaille, S. J. The program structure does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: subsampling and new estimators alleviate the problem. *Mol. Ecol. Resour.* 16, 608–627 (2016).
28. Meirmans, P. G. & Tienderen, P. H. V. GENOTYPE and GENODIVE: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Mol. Ecol. Notes* 4, 792–794 (2004).
29. Tjallingii, W. F. Electrical nature of recorded signals during stylet penetration by aphids. *Entomol. Exp. Appl.* 38, 177–186 (1985).
30. Giordanengo, P. EPG-Calc: a PHP-based script to calculate electrical penetration graph (EPG) parameters. *Arthropod-Plant Interact.* 8, 163–169 (2014).
31. Tjallingii, W. F. & Esch, T. H. Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals. *Physiol. Entomol.* 18, 317–328 (1993).
32. Smith, C. M. *Plant Resistance to Arthropods: Molecular and Conventional Approaches* (Springer Science & Business Media, 2005).
33. Cornille, A. *et al.* Postglacial recolonization history of the European crabapple (*Malus sylvestris* Mill.), a wild contributor to the domesticated apple. *Mol. Ecol.* 22, 2249–2263 (2013).
34. Nalam, V., Louis, J. & Shah, J. Plant defense against aphids, the pest extraordinaire. *Plant Sci.* 279, 96–107 (2019).

35. Richardson, A. T. *et al.* Discovery of a stable vitamin C glycoside in crab apples (*Malus sylvestris*). *Phytochemistry* 173, 112297 (2020).
36. Berrueta, L. A. *et al.* Relationship between hydroxycinnamic acids and the resistance of apple cultivars to rosy apple aphid. *Talanta* 187, 330–336 (2018).
37. Tosh, C. R., Powell, G. & Hardie, J. Maternal reproductive decisions are independent of feeding in the black bean aphid *Aphis fabae*. *J. Insect Physiol.* 48, 619–629 (2002).
38. Kang, Z.-W., Liu, F.-H., Zhang, Z.-F., Tian, H.-G. & Liu, T.-X. Volatile β -ocimene can regulate developmental performance of peach aphid *Myzus persicae* through activation of defense responses in Chinese cabbage *Brassica pekinensis*. *Front. Plant Sci.* 9, 708 (2018).
39. Marchetti, E. *et al.* Tissue location of resistance in apple to the rosy apple aphid established by electrical penetration graphs. *Bull. Insectol.* 62(2), 203–208 (2009).
40. Arnaoudov, V. & Kutinkova, H. Infestation by the rosy apple aphid (*Dysaphis plantaginea* PASS., Homoptera: Aphididae). *J. Fruit Ornament. Plant Res.* 14, 137–142 (2006).
41. Dapena, E., Miñarro, M. & Blázquez, M. D. Evaluation of the resistance to the rosy apple aphid using a genetic marker. *Acta Hort.* 814, 787–790 (2009).
42. Pagliarani, G. *et al.* Fine mapping of the rosy apple aphid resistance locus *Dp-fl* on linkage group 8 of the apple cultivar ‘Florina’. *Tree Genet. Genom.* 12, 56 (2016).

Discussion générale

Les huiles essentielles, des composés aux effets diversifiés altérant in fine la colonisation de la plante hôte par les Hémiptères phloémophages

Dans les deux études réalisées, nous avons cherché à évaluer dans quelle mesure les huiles essentielles peuvent perturber la colonisation de la plante par les Hémiptères phloémophages. Les étapes de la colonisation étudiées étaient la localisation de la plante et l'acceptation finale de la plante (ingestion de sève élaborée), qui peuvent être respectivement perturbées par la répulsivité et l'antiappétance-toxicité des huiles essentielles. Pour tester l'hypothèse de la répulsivité, les pucerons cendrés du pommier *D. plantaginea* et les psylles du poirier *C. pyri* étaient exposés par inhalation aux COV d'une huile essentielle par diffusion dans l'air. Pour tester l'hypothèse de l'antiappétance liée à l'ingestion des composés constituant une huile essentielle, celle-ci a été injectée dans le tronc des arbres pour être présentes dans le système vasculaire de la plante.

Les résultats de notre première étude montrent qu'une huile essentielle d'ail administrée par diffusion dans l'air était intrinsèquement répulsive et semblait masquer l'attractivité de la plante hôte, bien qu'elle n'ait pas permis d'empêcher sa colonisation. Les COV d'une huile essentielle d'ail ont perturbé le comportement alimentaire des deux Hémiptères, principalement dans les tissus superficiels des plantes hôtes. Un retard d'accès au phloème a été observé pour les pucerons et les psylles, ainsi qu'une durée d'ingestion de sève phloémienne réduite pour les psylles seulement. Les résultats de la seconde étude montrent que l'injection d'une huile essentielle de cannelle de Chine, du fait de son caractère antiappétant, a drastiquement réduit le pourcentage de pucerons ingérant de la sève phloémienne ce qui a entraîné leur mort par famine. Chez les psylles, l'activité dans le phloème n'a pas été impactée, mais au quatrième jour suivant l'injection, le taux de survie des psylles s'est mis à diminuer sur les arbres injectés. Dans ce dernier cas ce sont plutôt les propriétés toxiques de l'huile essentielle qui seraient en cause. A l'issue de la période de dix jours durant laquelle la survie des pucerons et des psylles a été relevée, aucun impact n'a été observé sur la masse, et ce pour les deux espèces d'Hémiptères étudiées.

La perturbation de l'environnement olfactif résulte en une perturbation du comportement alimentaire

Les deux méthodes d'application des huiles essentielles, par diffusion des COV dans l'air ou par injection dans le tronc, ont pu modifier l'environnement olfactif des pucerons et des psylles.

Dans la première étude, les pucerons exposés aux COV d'une huile essentielle d'ail émis par des diffuseurs réalisaient un plus grand nombre d'insertion des stylets dans la plante comparés aux pucerons non exposés aux volatils. Une telle modification du comportement alimentaire a aussi été observée par Dardouri *et al.* (2021), qui ont montré que l'effet répulsif des deux plantes compagnes connues pour leur émission de volatils répulsifs, le souci *T. patula* L. et le basilic

O. basilicum L., se traduisait par un plus grand nombre d'insertion des stylets pour *M. persicae* sur sa plante hôte, le poivron. Dans cette même étude, ils ont montré que la présence de *O. basilicum* conduisait à une diminution de l'activité totale des stylets dans la plante hôte, un retard à l'accès au phloème ainsi qu'une diminution de la durée totale d'ingestion de sève phloémienne. Ces modifications correspondent à celles également observées dans notre étude chez les psylles exposés à une huile essentielle d'ail. Baudry *et al.* (2021) ont montré que l'exposition de *M. persicae* aux volatils de poireau *A. porrum*, dont la répulsivité est connue, a engendré un retard d'accès au phloème et une diminution de la durée d'ingestion de sève phloémienne. Ces perturbations ont été observées chez les psylles exposés à une huile essentielle d'ail, ce qui renforce donc notre hypothèse que les COV répulsifs de l'huile essentielle d'ail seraient responsables de l'altération du comportement alimentaire des psylles. Les deux principaux composés de l'huile essentielle d'ail utilisée dans la première étude de ce chapitre, le disulfure de diallyle et le trisulfure de diallyle, sont très probablement responsables des propriétés répulsives de l'huile essentielle d'ail comme cela a été démontré pour les Diptères et les Coléoptères (Campbell *et al.*, 2011 ; Plata-Rueda *et al.*, 2017). Ce sont donc sûrement ces composés qui sont responsables des modifications du comportement alimentaire des pucerons et des psylles.

Dans la seconde étude, pour les Hémiptères soumis aux plantes injectées avec une huile essentielle de cannelle et par rapport à ceux sur les plantes contrôles, (1) l'augmentation de la durée avant la première insertion des stylets plus importante pour *D. plantaginea* et *C. pyri*, (2) la diminution de la durée totale d'activité dans le mésophylle pour *D. plantaginea* et (3) l'augmentation du nombre d'insertions des stylets par *C. pyri* suggèrent une émission de COV répulsifs par les plantes injectées. En effet, ces modifications correspondent à celles observées dans notre première étude pour les pucerons et psylles exposés aux COV d'une huile essentielle d'ail ou de nouveau à ce que Dardouri *et al.* (2021) ont observé pour *M. persicae* en présence de plantes compagnes. Werrie *et al.* (2021), avec le même protocole d'injection que celui que nous avons utilisé mais appliqué à *M. domestica*, ont montré que suite à l'injection d'une huile essentielle de cannelle de chine *C. cassia* des quantités plus importantes d'un ensemble de sesquiterpènes (caryophyllène, germacrène, α -farnésène, bergamotène et (E,E)-4,8,12-triméthyltridéca-1,3,7,11-tétraène (TMTT)), ainsi que des monoterpènes (terpinen-4-ol et linalool), et le (E)-4,8-diméthyl-nonatriène (DMNT), ont été émis par les pommiers injectés. Ces composés sont connus pour leurs effets répulsifs ou toxiques sur plusieurs espèces de pucerons (Bruce *et al.*, 2005; Abbassy *et al.*, 2009), ce qui peut expliquer une partie des modifications du comportement alimentaire observées ici pour les pucerons et les psylles soumis aux plantes injectées. Parce que les impacts de l'injection sur le comportement alimentaire ont été observés directement après les 24 heures d'injection passive mais aussi cinq jours après l'injection, les composés seraient rapidement transloqués du xylème où ils ont été injectés, et dans le même temps présenteraient une persistance importante dans le végétal. La translocation des huiles essentielles dans les tissus du pommier et leur diffusion dans l'air ambiant sont conditionnées par leurs propriétés physico-chimiques. D'un point de vue

histologique, ces composés doivent diffuser à travers les phases aqueuses du mésophylle, les membranes des cellules, puis dans les cavités proches des stomates avant de les traverser pour être libérés dans l'atmosphère (Werrie *et al.*, 2021).

L'hypothèse de l'antiappétance des huiles essentielles est validée bien que les effets soient contrastés entre les deux espèces d'Hémiptères

Pour discuter des effets des huiles essentielles sur le comportement alimentaire des Hémiptères phloémophages, nous ferons la distinction entre l'antiappétance (quand le composé est présent dans la sève phloémienne et induit directement une diminution de la quantité de sève ingérée) et ce qui est parfois désigné sous le terme de « feeding deterrency » dans la littérature, qu'on appellera ici « dissuasion alimentaire » (le composé est présent dans l'environnement olfactif des insectes et engendre une diminution de l'ingestion de sève phloémienne mais en impactant l'activité des stylets dans les tissus périphériques de la plante).

Comme cela a été précédemment détaillé, il est fortement probable que la répulsivité des COV d'une huile essentielle d'ail ait induit une diminution de l'ingestion de sève phloémienne pour les psylles, due à un retard d'accès au phloème. Cet effet correspond à de la dissuasion alimentaire. Bien que les volatils exogènes puissent pénétrer la cuticule et l'épiderme des plantes, et passer dans les tissus plus profonds (Dancewicz *et al.*, 2016), dans notre cas rien ne suggère que les volatils aient atteint le phloème. Dans la seconde étude, cependant, la plus faible proportion de pucerons ingérant de la sève phloémienne suggère une translocation des composés de l'huile essentielle du xylème où ils ont été injectés, au phloème. Le cinnamaldéhyde, le composé majoritaire de l'huile essentielle de *C. cassia* utilisée dans notre étude (~80% de la composition de l'huile essentielle) a été décrit pour ses effets antiappétants sur deux espèces de Lépidoptères (Huang & Ho, 1998) : ainsi la modification du comportement alimentaire des pucerons dans le tissu phloémien est très probablement imputable à la présence de ce composé dans la sève phloémienne.

Les deux modèles d'insectes étudiés ici, pucerons et psylles, n'ont pas eu la même sensibilité aux deux modes d'exposition. Les pucerons ont été plus sensibles à l'injection de l'huile essentielle dans le tronc : la diffusion des COV a abouti à une réduction de 25% de la durée totale d'ingestion de sève phloémienne et à une réduction de 10% de l'effectif de pucerons réalisant cette phase, comparées à une réduction de 45% de la durée d'alimentation et de 40% de l'effectif des pucerons dans le cas de l'injection. Les psylles quant à eux ont été plus sensibles à la diffusion des COV d'huile essentielle : cette méthode a engendré 50% de réduction de la durée d'ingestion comparés à 5 % dans le cas de l'injection. Bien que le processus de sélection de la plante hôte semble assez commun aux pucerons et psylles, les étapes précédant l'insertion des stylets dans la plante semblent revêtir plus d'importance dans le succès de colonisation de la plante chez les psylles. En effet, bien que les stylets des psylles soient théoriquement capables d'atteindre n'importe quel type de cellule dans la plante à partir de n'importe quel site d'entrée sur la surface de la feuille, Ullman & McLean (1988b) ont révélé que l'insertion des stylets au-dessus d'un faisceau vasculaire entraîne une augmentation significative de la probabilité

d'alimentation. Ainsi, lors de la diffusion d'huile essentielle d'ail, la perturbation des premières étapes de la colonisation de la plante a pu engendrer une diminution de la prise de sève phloémienne chez *C. pyri* en modifiant son activité à la surface de la feuille.

Hypothèse d'une activation de la défense des plantes selon les deux modes d'utilisation des huiles essentielles

Les deux modes d'application des huiles essentielles testés dans nos travaux sont susceptibles d'avoir des effets indirects sur le comportement alimentaire des Hémiptères ravageurs phloémophages via l'induction des défenses de la plante hôte. Cette induction pourrait être un autre mécanisme pouvant expliquer ou contribuer aux effets des huiles essentielles sur le comportement alimentaire des pucerons et des psylles. En effet, Moreno-Delafuente *et al.* (2020) ont montré que sur les plants de melon *C. melo* traités avec un analogue d'acide salicylique inducteur de la résistance systémique des plantes, le comportement alimentaire d'*A. gossypii* était modifié. Sur les plantes dont la résistance systémique était induite, l'activité globale des stylets des pucerons dans la plante était réduite, l'accès au phloème était retardé et la durée d'ingestion de sève phloémienne était réduite. Ces trois modifications correspondent justement à celles observées dans notre première étude pour les psylles exposés au COV d'une huile essentielle d'ail et dans notre seconde étude pour les pucerons soumis aux pommiers dans lesquels une huile essentielle de cannelle avait été injectée.

Les COV de plantes soumises à des attaques de phytophages sont capables d'induire la défense de plantes voisines (Karban *et al.*, 2014; Ninkovic *et al.*, 2019). Néanmoins, même sans dommages particuliers, il s'avère que les COV d'une espèce de plante donnée peuvent aussi engendrer l'induction de défenses d'une autre espèce de plante. L'induction des défenses d'une plante par les COV d'une plante d'une autre espèce consiste notamment en une augmentation de l'émission de COV répulsifs (Dahlin *et al.*, 2015; Tolosa *et al.*, 2019). Ainsi, il est possible que les COV d'une huile essentielle d'ail aient pu déclencher l'activation des mécanismes de défense des plants de pommiers et de poiriers et ainsi participer à la modification du comportement alimentaire des pucerons et des psylles. Werrie *et al.* (2022) ont montré, en utilisant la qRT-PCR sur les gènes impliqués dans les principales voies de défense du pommier, que l'injection d'une huile essentielle de *C. cassia* induisait une augmentation de l'expression de ces gènes après l'injection de façon similaire à celle d'un produit stimulateur de défense naturel Bion[®], inducteur de résistance systémique acquise. De plus, une expression prolongée des gènes impliqués dans la modification pariétale ainsi que dans la synthèse des protéines de défense vis-à-vis des pathogènes et des phénylpropanoïdes a été observée. Les métabolites de la voie des phénylpropanoïdes, les acides hydroxycinnamiques, en particulier l'acide 4-caféoylquinique (4-CQA) et l'acide 4-p-coumaroylquinique (4-pCoQA), ont été identifiés comme les principaux acteurs de la résistance des cultivars de pommiers vis-à-vis de *D. plantaginea* (Berrueta *et al.*, 2018). Ceci peut en partie expliquer la forte perturbation du comportement alimentaire de *D. plantaginea* observée dans notre étude suite à l'injection d'une huile essentielle de cannelle. Les effets de l'injection d'huile essentielle sur les défenses du

poirier *P. communis* n'ont à notre connaissance pas encore été étudiés. Dans notre étude, seuls les paramètres en lien avec l'activité des stylets de *C. pyri* dans les tissus superficiels ont été impactés par l'injection. Comme nous l'avons vu dans la première section de cette discussion, ceci suggère éventuellement une modification du profil des volatils émis en lien avec l'induction des défenses de la plante. Contrairement à ce qui est observé pour les pucerons, l'absence d'effet au niveau de la phase phloémienne suggère un effet limité de l'injection d'huile essentielle de *C. cassia* sur les défenses induites du poirier *P. communis*.

Conséquences agronomiques de l'utilisation des huiles essentielles

D'un point de vue agronomique, notre étude sur l'effet d'une huile essentielle d'ail émis par diffusion ne semble pas montrer de réelle capacité de cette méthode à protéger les plantes des pucerons et des psylles. En effet, bien que cette huile essentielle se soit avérée répulsive, les Hémiptères ont tout de même choisi les plantes qui étaient associées aux diffuseurs d'huiles essentielles. Chez les pucerons, la diminution de la durée d'ingestion de sève phloémienne était relativement faible pour les individus exposés aux COV de l'huile par rapport aux pucerons non exposés (environ 25%). Cette diminution était plus importante pour les psylles : l'exposition aux COV a entraîné une réduction d'environ 50% de la durée d'ingestion de sève phloémienne par rapport aux psylles non exposés. Une diminution de l'ingestion de sève phloémienne est souvent liée à une diminution de la survie et/ou de la fécondité (Chesnais *et al.*, 2019). Cependant, l'effet contraire peut également être observé : par exemple, Baudry *et al.* (2021) ont montré que la présence de volatils de poireau *A. porrum*, tout en altérant le comportement de prise de sève phloémienne, pouvait augmenter la fécondité, la survie et la biomasse de *M. persicae*. Cet effet probiotique a aussi été mis en évidence chez des bombyx du mûrier *Bombyx mori* (Bombycidae) L. : suite à une exposition à des COV d'ail pendant leur développement larvaire, les femelles une fois adultes ont vu leur fécondité et l'éclosion de leurs œufs augmentées (Bharti *et al.*, 2013).

Le manque d'effet drastique des COV d'une huile essentielle d'ail sur la localisation de la plante et le comportement alimentaire des deux Hémiptères étudiés ici peut être potentiellement dû à l'utilisation d'une dose trop faible d'huile essentielle. Des expériences préliminaires ont été réalisées en amont de l'étude de la répulsivité de l'huile essentielle d'ail pour déterminer la dose avec laquelle travailler. Les doses par diffuseur testées étaient de 0,5 ; 1 ; 5 ; 25 et 50 mg d'huile essentielle diluées dans de l'éthanol. Dans ces expériences préliminaires nous avons utilisé le set-up de test de choix (utilisé dans l'article n°1 de ce manuscrit de thèse), avec de part et d'autre du pont en plastique un diffuseur contenant de l'huile essentielle d'ail vs. un diffuseur contenant de l'éthanol. Cependant une limite haute a été trouvée à partir de laquelle la pièce était probablement saturée en COV car nous n'observions alors plus de répulsivité de l'huile essentielle d'ail. Ainsi, les contraintes liées au set-up expérimental utilisé ont peut-être empêché l'identification de la concentration en huile essentielle minimale requise pour empêcher la localisation de l'hôte quand deux pommiers (un associé à l'huile essentielle et l'autre non) étaient présentés aux pucerons et aux psylles lors des tests de choix (modalité D). L'huile

essentielle d'ail étant aussi connue pour son activité antimicrobienne, notamment envers les champignons phytopathogènes (Chen *et al.*, 2018) et antibactérienne (Saravanan *et al.*, 2010), son utilisation pourrait donc permettre de cibler aussi bien des pathogènes que des ravageurs en fonction des pressions en bioagresseurs ou du cycle de développement de la plante.

L'injection d'huile essentielle directement dans la plante hôte semble être la méthode la plus efficace pour protéger les vergers de *D. plantaginea* et *C. pyri*. En effet, bien que l'attractivité de la plante injectée n'ait pas été testée, il est probable que la modification des COV émis la limite. De plus, les effets drastiques sur l'alimentation des pucerons cendrés du pommier *D. plantaginea* et la mortalité rapide obtenue chez ce puceron et le psylle du poirier *C. pyri* soumis aux plantes traitées devraient contribuer à limiter les dommages qu'ils induisent sur leurs plantes hôtes. L'injection de pesticides de synthèse dans les pommiers et les poiriers s'est déjà avérée efficace dans le contrôle de *D. plantaginea* (VanWoerkom *et al.*, 2014) et de *C. pyri* (Ardestanirostami *et al.*, 2016; Wheeler *et al.*, 2020), il semble donc approprié de continuer à développer cette méthode de protection des vergers mais en ayant cette fois plutôt recours à des biopesticides tels que des huiles essentielles.

Les Surfactines, les lipopeptides avec la plus forte activité aphicide mais aux effets sublétaux contrastés

Nos travaux conduits sur les lipopeptides bactériens visaient à comparer les activités insecticides des trois familles de lipopeptides extraits de *Bacillus sp.*, les Surfactines, les Iturines et les Plipastatines, et tester l'existence de leur éventuel effet synergique. Au-delà des effets insecticides, les études conduites visaient à identifier les effets sublétaux des lipopeptides sur les pucerons et leurs parasitoïdes.

Les Surfactines ont montré un effet aphicide à toutes les concentrations testées, tandis que les Plipastatines n'étaient létales qu'aux plus fortes concentrations testées ; aucun effet synergique n'a été observé. Les effets sublétaux des lipopeptides sur la locomotion des pucerons étaient contrastés en fonction des familles de lipopeptides testés, mais aussi en fonction des stades des pucerons qui étaient exposés. Enfin, les pucerons *D. plantaginea* ayant survécu à l'exposition aux Surfactines avaient une durée d'ingestion de sève plus importante que les pucerons non exposés, tandis que l'inverse était observé pour les pucerons *A. fabae*. Enfin, le comportement de sélection de l'hôte par les femelles parasitoïdes *A. matricariae* n'a pas été impacté par l'exposition des pucerons hôtes aux Surfactines.

Des effets aphicides contrastés des familles de lipopeptides sans effets synergiques

Les différences d'activité aphicide mesurées dans notre travail entre les familles de lipopeptides sont à l'image des autres activités des lipopeptides, comme les activités antifongiques et antibactériennes pour lesquelles les efficacités des différentes familles divergent (Ongena *et al.*,

2007). Les différences d'efficacité antifongique semblent être liées à la façon dont les lipopeptides interagissent avec les membranes cellulaires (Ongena *et al.*, 2007). Aucun effet synergique n'a été mis en avant concernant l'activité insecticide des lipopeptides contrairement à l'effet antifongique (Desmyttere *et al.*, 2019). Cet effet synergique d'activité fongicide viendrait du fait que les lipopeptides tels que les Surfactines et les Iturines interagissent en formant des micelles mixtes, qui agissent plus efficacement que les micelles simples sur les membranes biologiques (Maget-Dana *et al.*, 1992). L'effet aphicide des Surfactines par contact topique est probablement dû à leur capacité à interagir avec la cuticule (M. Rodríguez *et al.*, 2018); il est donc probable que ces micelles mixtes aient une capacité d'interaction plus faible avec les cuticules des pucerons que lorsque les Surfactines sont appliquées seules.

Concernant la comparaison de l'effet aphicide des Surfactines sur *D. plantaginea*, un puceron spécialiste des pommiers, et *A. fabae*, un puceron généraliste, il est étonnant de constater que la mortalité était plus importante pour *A. fabae*. Suite à l'application topique de Surfactines à la concentration de 1g/L, la mortalité des pucerons *A. fabae* adultes était de ~32% et celle des pucerons *D. plantaginea* de ~25%. A 2,5 g/L la mortalité des pucerons *A. fabae* adultes était de ~57% et celle des pucerons *D. plantaginea* de ~40%. De plus, la dynamique de mortalité semblait assez différente entre les deux espèces de pucerons, car la mortalité d'*A. fabae* semblait surtout survenir dans les 24h suivant l'exposition, tandis que pour *D. plantaginea* la mortalité se produisait majoritairement dans la première heure suivant l'exposition. Ces résultats sont surprenants dans la mesure où les insectes généralistes sont considérés comme plus résistants aux pesticides que les spécialistes. Ceci serait lié au fait que ces derniers sont confrontés à une diversité de composés de défense plus réduite, ce qui limite la diversité des mécanismes de résistance aux pesticides (Alyokhin & Chen, 2017). Dans notre cas, il est probable que cette différence s'explique par le fait que c'est un clone qui a été utilisé pour *A. fabae* tandis que c'était une population pour *D. plantaginea* ; dans ce dernier cas, la diversité génétique pourrait favoriser un niveau de résistance plus important à l'échelle de la population. Enfin, dans la mesure où la tolérance aux pesticides semble corrélée à la taille/masse des organismes ciblés (Robertson *et al.*, 1981; Savin *et al.*, 1982), la différence de mortalité pourrait donc être également attribuable aux différences de masse entre les pucerons. Dans ce cas on s'attendrait à ce que les pucerons *A. fabae* aient une masse plus faible que ceux de l'espèce *D. plantaginea* ce qui expliquerait leur plus grande sensibilité. Cependant on observe exactement l'inverse : les adultes pèsent environ 560 µg chez *D. plantaginea* (Denoirjean *et al.*, 2021) contre environ 710 µg chez *A. fabae* (Banks & Macaulay, 1964). Bien que ces résultats soient contraires à notre première hypothèse, Robertson (1982) et Reissig *et al.* (1986) ont montré que chez deux espèces de tordeuses, *Choristoneura occidentalis* et *Choristoneura rosaceana*, la sensibilité aux insecticides augmentait avec la masse des individus traités. Les résultats que nous avons obtenus correspondent à ce cas de figure : la masse plus importante d'*A. fabae* par rapport à celle de *D. plantaginea* pourrait donc expliquer sa plus grande sensibilité aux Surfactines.

Des effets sublétaux contrastés sur le comportement locomoteur des pucerons

Les effets sublétaux des lipopeptides sur le comportement locomoteur des pucerons ont conduit soit à une inhibition (dispersion réduite suite à l'exposition au mélange ternaire dans la première étude et taux de larves inactives plus important suite à l'exposition aux Surfactines sur les larves dans la seconde étude) soit à une augmentation (vitesse et dispersion accrues suite à l'exposition aux Iturines pour la première étude et aux Surfactines pour les adultes dans la seconde). Ces effets sont considérés comme des symptômes d'une intoxication, survenant avant la mort de l'individu (Gómez-Guzmán *et al.*, 2017). Dans la première étude, il est donc étonnant d'observer ces modifications pour les Iturines, pour lesquelles aucun effet insecticide n'a été détecté, et de ne voir aucun effet sublétal des Surfactines sur le comportement locomoteur de *D. plantaginea*. Dans la seconde étude, les différences observées entre larves et adultes pourraient s'expliquer par le fait que les deux stades ne présentent pas la même sensibilité vis-à-vis des Surfactines. Chez les rats, certains agents neurotoxiques comme les solvants sont connus pour induire une hyperactivité à faible dose et une hypoactivité à dose plus élevée (Frantík & Horváth, 1992). La diminution de l'activité locomotrice chez les larves et son augmentation chez les adultes suite à l'exposition aux Surfactines reflètent donc la plus grande sensibilité des larves, ce qui est confirmé par les taux de mortalité plus importants pour ce stade comparé aux adultes à une même concentration de lipopeptides.

... et également sur leur comportement alimentaire

Seules les Surfactines semblent avoir des effets sublétaux sur le comportement alimentaire des pucerons, qui se sont avérés radicalement différents entre les deux espèces de pucerons. Pour *D. plantaginea*, comparés aux contrôles, les pucerons survivants à l'exposition aux Surfactines ont ingéré de la sève phloémienne pendant une durée plus importante. Pour *A. fabae*, comparés aux contrôles, les pucerons survivants avaient une durée d'ingestion de sève phloémienne réduite, et une durée d'ingestion de sève xylémienne et de déraillement des stylets plus importantes. Des insecticides de synthèse tels que le chlordiméforme peuvent aussi produire des effets opposés (réduction de l'alimentation ou hyperphagie) chez différentes espèces. L'application de ce pesticide à des doses sublétales peut par exemple entraîner une réduction de l'activité alimentaire des blattes (Beeman & Matsumura, 1978), des insectes piqueurs-suceurs (pucerons, cicadelles et sauterelles) (Hirata & Sogawa, 1976) ou encore de larves de Lépidoptères (Watanabe & Fukami, 1977). Cependant, des applications sublétales de ce même pesticide ont entraîné une augmentation de la consommation d'eau sucrée chez des femelles parasitoïdes adultes (O'Brien *et al.*, 1985) et des Diptères (Long & Murdock, 1983). Il est probable que ceci soit lié à la dose à laquelle les organismes sont exposés : sur un tout autre modèle, le rat de laboratoire *Rattus norvegicus* (Muridae) Berkenhout, à faible dose le chlordiméforme stimule l'alimentation des rats tandis qu'à des doses sublétales plus élevées, il provoque une diminution de l'alimentation (Pfister *et al.*, 1978). Ces effets contrastés d'un même pesticide sur le comportement alimentaire des organismes traités ont donc été observés soit sur des taxons d'insectes différents, soit sur un même organisme mais qui est un

mammifère. Nous avons donc mis en évidence les effets antagonistes d'un même pesticide sur un même modèle d'organisme, les pucerons phloémophages. De la même manière que pour la tolérance aux effets létaux des Surfactines, nous nous étions attendus à ce que les effets des Surfactines sur le comportement alimentaire soient plus délétères pour le puceron spécialiste *D. plantaginea* comparés à ceux observés pour le puceron généraliste *A. fabae*. Or nous avons observé exactement l'inverse : suite à l'exposition aux Surfactines, la durée d'ingestion de sève était augmentée pour *D. plantaginea* et réduite pour *A. fabae*. Ce résultat peut être le reflet de la plus grande sensibilité d'*A. fabae* aux Surfactines, discutée dans le précédent paragraphe. Dans les études qui ont été menées dans ce chapitre, les pucerons ont été exposés à des concentrations létales (CL) différentes (CL 30 pour *A. fabae* et CL 40 pour *D. plantaginea*). Une augmentation de la DL de 10 points peut induire des effets drastiques sur d'autres paramètres, comme par exemple une diminution du nombre moyen d'œufs chez *Spodoptera frugiperda* (Cruz *et al.*, 2016). Les Surfactines doivent donc avoir des mécanismes létaux et sublétaux différenciés entre ces deux espèces de pucerons, encore non décrits dans la littérature.

Mais pas d'effets sublétaux sur le comportement de sélection des pucerons hôtes par les femelles parasitoïdes

Comme cela a été renseigné dans la discussion du second article de ce chapitre, à notre connaissance, les quelques études portant sur l'effet de l'exposition des hôtes aux insecticides ont révélé des effets contrastés sur le comportement de sélection des hôtes par les femelles parasitoïdes. Alors que l'exposition des hôtes aux pesticides peut réduire le taux d'attaque des parasitoïdes (Umoru & Powell, 2002), nos résultats sont en accord avec les études mettant en évidence une absence de discrimination en termes de comportement de ponte des parasitoïdes entre les hôtes exposés et non exposés (Irving & Wyatt, 1973; De Zutter *et al.*, 2016). Dans la mesure où les larves de parasitoïdes dépendent de la capacité de leur mère à évaluer avec précision la qualité des hôtes pour le développement de la progéniture, on pourrait supposer que l'absence de discrimination entre les deux types d'hôtes (exposés et non exposés aux Surfactines) signifie que la performance des descendants des femelles sera équivalente quel que soit leur hôte. Cependant, dans les faits il est difficile de prédire, à partir de la préférence des femelles, la performance de leur descendance. En effet, plusieurs études montrent que quand des parasitoïdes généralistes comme *A. matricariae* ont le choix entre plusieurs hôtes, les femelles parasitoïdes peuvent préférer les hôtes pourtant les moins favorables au développement larvaire (par exemple, un taux de momification et d'émergence plus faibles) et minimisant la performance de leurs descendants (Henry *et al.*, 2005; Chesnais *et al.*, 2015). Dans l'étude de Henry *et al.* (2005), les femelles d'*A. matricariae* ont préféré déposer leurs œufs dans des pucerons de stades plus tardifs, ce qui a abouti à une absence de mâles et un sex-ratio complètement biaisé en faveur des femelles dans la descendance. Bien qu'un sex-ratio biaisé en faveur des femelles soit considéré comme bénéfique pour leur activité de régulation des ravageurs (Delpuech & Meyet, 2003), la présence d'un seul sexe limitera à terme la population de parasitoïdes et donc sa capacité de régulation naturelle.

Au-delà des effets indirects des lipopeptides sur les parasitoïdes via les pucerons, dans un contexte où les Surfactines seraient vaporisées sur les colonies de pucerons pour leur contrôle, les parasitoïdes pourraient être directement et non intentionnellement exposés aux lipopeptides, notamment au stade momie. L'exposition des momies de parasitoïdes aux pesticides peut entraîner la mortalité des nymphes et donc une réduction du taux d'émergence des parasitoïdes (Torres *et al.*, 2003; Sabahi *et al.*, 2011). Le traitement des momies peut aussi impacter des paramètres démographiques tels que le taux d'accroissement intrinsèque, le taux de reproduction brut, ou encore le temps de génération moyen (Mardani *et al.*, 2016). Dans les différentes études citées, en fonction des concentrations ou des molécules utilisées, l'exposition des momies pouvait aussi n'avoir aucun impact sur la survie des individus ou leurs traits d'histoire de vie. De plus, les parasitoïdes sont parfois plus résistants au stade de momie qu'au stade adulte (Desneux *et al.*, 2006; Vogt & Weigel, 1999). Ainsi, sans évaluer les effets de l'exposition des parasitoïdes aux stades momie et adulte, il est impossible de prédire les effets directs des Surfactines sur les parasitoïdes de pucerons et conséquemment, leur capacité de régulation naturelle.

L'efficacité aphicide semble malgré tout trop faible pour une applicabilité en vergers

Les lipopeptides pourraient donc être utilisés pour une protection globale des vergers vis-à-vis des pathogènes et des ravageurs, d'autant plus que les Surfactines sont incluses dans la majorité des mélanges antifongiques disponibles sur le marché (Denoirjean *et al.*, 2022). Cependant, les doses pour lesquelles nous avons trouvé un effet aphicide sont très supérieures à celle utilisée pour les effets fongicides. Par exemple, en laboratoire, la CI50 (concentration de la substance à laquelle 50% du développement fongique est inhibé) pour l'agent de la tavelure est d'environ 4 mg/L pour les Surfactines envers une souche sensible, et de moins de 2 mg/L pour un mélange Surfactines/Plipastatines envers une souche résistante (Desmyttere *et al.*, 2019). La concentration en Surfactines la plus faible testée dans notre étude était de 0,5 g/L. Yun *et al.* (2013) ont quant à eux obtenu une CL50 proche de 20 mg/L pour des Surfactines déposées en contact topique sur des larves de *M. persicae*, et Yang *et al.* (2017) ont quant à eux obtenu des CL50 allant de 20 à 55 mg/L pour trois différents isomères de Surfactines, là aussi vis-à-vis de larves de *M. persicae*. Bien que ces dernières concentrations soient plus faibles, elles restent largement supérieures à celle appliquée *in vitro* pour lutter contre les phytopathogènes fongiques. Comme cela a été évoqué plus haut, la CI50 pour l'agent de la tavelure est d'environ 4 mg/L pour les Surfactines envers une souche sensible, et de moins de 2 mg/L pour un mélange Surfactines/Plipastatines envers une souche résistante (Desmyttere *et al.*, 2019). Dans le cas d'une utilisation d'un mélange ternaire des trois familles de lipopeptides, cette IC50 est de 0,043 mg/L pour la souche sensible. Les concentrations utilisées dans nos études sont au moins 125 fois plus élevées que celles utilisées dans l'étude des effets antifongiques des lipopeptides, ce qui révèle la faible efficacité de l'activité aphicide des lipopeptides comparés à leurs autres activités biocides.

Enfin, l'éventualité de l'utilisation des lipopeptides en vergers nécessite d'acquérir des connaissances sur leurs possibles effets non-intentionnels sur les organismes non-cibles. Les Surfactines par exemple peuvent être létales pour des insectes appartenant à différents taxons tels que les Lépidoptères (Guo *et al.*, 2015), les Diptères (moustiques (Geetha *et al.*, 2012), drosophilidés (Assié *et al.*, 2002)) et les Hémiptères (pucerons (Guo *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2017; Yun *et al.*, 2013)). Les effets létaux des lipopeptides sont observés par ingestion (Ben Khedher *et al.*, 2017, 2015; Ghribi *et al.*, 2012) ou par contact topique (Rodríguez *et al.*, 2018), respectivement en induisant des dommages sur les tissus de l'intestin et en interagissant avec la cuticule. Leur mode d'action peu spécifique reposant sur l'interaction avec les membranes biologiques et la diversité des taxons vis-à-vis desquels ces molécules sont létales peuvent favoriser les effets non-intentionnels des lipopeptides et donc constituer des freins à leur utilisation en vergers.

La perturbation du comportement alimentaire de *D. plantaginea* par les pommiers est essentiellement basée sur des facteurs de résistance présents dans le phloème, mais a peu de conséquence sur la performance

Dans ce chapitre, nous avons cherché à étudier les effets de la résistance des pommiers sur la préférence et la performance de *D. plantaginea* en s'intéressant au pommier domestique *M. domestica* (comparaison de variétés) et à l'espèce sauvage *M. sylvestris*, contributrice de la domestication du pommier (comparaison de populations). Nous avons cherché plus particulièrement à mettre en lien, dans la première étude, le comportement alimentaire des pucerons et la performance des parasitoïdes pour évaluer les effets bottom-up potentiels des variétés de pommiers domestiques sur le troisième niveau trophique. Dans la seconde étude, l'objectif était de rechercher un éventuel lien entre la structure génétique des pommiers sauvages et le comportement alimentaire des pucerons.

Dans la première étude, les pucerons soumis aux variétés Ariane et Greensleeves de *M. domestica* avaient un comportement alimentaire réduit en terme de durée d'activité dans le phloème comparés aux pucerons soumis à la variété Gala. Les pucerons sur la variété Greensleeves avaient une masse réduite pour les larves, un taux et une masse de lipides plus élevés chez les adultes, et un taux d'eau plus faible chez les deux stades. Les parasitoïdes qui s'étaient développés dans les pucerons soumis aux variétés Ariane et Greensleeves avaient une durée de développement plus longue que les parasitoïdes qui avaient pour hôtes les pucerons élevés sur la variété Gala.

Dans la seconde étude, les pucerons soumis aux pommiers qui étaient proches génétiquement semblaient avoir le même comportement alimentaire. Pour les pucerons soumis aux populations danoise et française de *M. sylvestris*, l'activité des stylets dans le phloème était réduite comparée à celle des pucerons soumis à la population roumaine de *M. sylvestris* et à *M. domestica*. Aucune différence de fécondité ou de survie des pucerons n'a été observée, mais les

pucerons soumis à la population danoise de *M. sylvestris* avaient une masse plus faible que celle des pucerons soumis à *M. domestica*.

Les effets des pommiers sur le comportement alimentaire de D. plantaginea semblent essentiellement liés à des facteurs de résistance dans le phloème

Dans les deux études, la principale modification du comportement alimentaire observée était relative à l'activité des stylets dans le phloème. Marchetti *et al.* (2009) ont montré que pour les pucerons soumis à une variété possédant une forte résistance à *D. plantaginea* (Florina), comparés aux pucerons sur une variété sensible : (1) la durée de l'activité globale des stylets dans la plante était réduite (2) celle du déraillement des stylets était augmentée et (3) aucun des pucerons n'avait ingéré de la sève phloémienne. Comme cela a été évoqué dans la discussion de l'article de Marchetti *et al.* (2009), cette absence d'ingestion de sève phloémienne est très probablement due à la présence de métabolites secondaires dans le phloème. Les acides hydroxycinnamiques, notamment l'acide 4-caffeoylquinique (4-CQA) et l'acide 4-p-coumaroylquinique (4-pCoQA), ont été identifiés comme les principaux composés responsables de la résistance aux pucerons cendrés. En effet, l'isomérisation 5-CQA → 4-CQA est favorisée chez les cultivars résistants, alors que l'isomérisation 5-pCoQA → 4-pCoQA est favorisée chez les cultivars sensibles (Berrueta *et al.*, 2018). Les mécanismes biochimiques aboutissant à une plus grande accumulation de 4-CQA pourraient donc être responsables de la diminution d'ingestion de sève phloémienne observée dans nos études. D'autres composés secondaires comme les flavonoïdes peuvent aussi être responsables de cette modification de comportement alimentaire. En effet, ces molécules sont connues pour leurs effets antiappétants sur les pucerons (Dreyer & Jones, 1981) et peuvent expliquer la résistance observée pour les cultivars d'autres cultures (Lattanzio *et al.*, 2000). Chez le pommier, des flavonoïdes tels que les phlorétines ou les phloridzines sont présents dans la peau et la chair des fruits (Tsao *et al.*, 2003), mais ne semblant pas être présents dans le phloème, ils n'ont pas d'effet sur le comportement alimentaire de pucerons comme *A. pomi* (Montgomery & Arn, 1974). Ainsi, de plus amples recherches sur les composés présents dans la sève phloémienne des pommiers pourraient donc permettre d'identifier les molécules antiappétantes potentiellement responsables de l'altération du comportement alimentaire de *D. plantaginea* observée dans nos études.

Dans les travaux effectués dans ce chapitre, nous n'avons pas mesuré de résistance comparable à celle du cultivar Florina au niveau de l'impact sur le comportement alimentaire, pour lequel une absence totale d'ingestion de sève phloémienne des pucerons cendrés du pommier *D. plantaginea* était observée (Marchetti *et al.*, 2009). Notre résultat s'en rapprochant le plus serait celui obtenu dans notre première étude, où seulement 7,70 % des pucerons soumis à la variété Ariane ont réalisé une ingestion soutenue de sève phloémienne.

La modification du comportement alimentaire a cependant peu de conséquences sur la performance ou les traits d'histoire de vie des pucerons

Dans nos deux études, la performance des pucerons était impactée par les différents niveaux de résistance de leur hôte, et ceci est probablement la conséquence de la modification du comportement alimentaire détaillée dans le précédent paragraphe. En effet, la réduction de la phase phloémienne peut entraîner une réduction de la fécondité, de la durée de vie ainsi que de la taille de pucerons de différentes espèces telles que *A. pisum*, *Melanaphis sacchari* (Aphididae) Zehntner et *M. euphorbiae* (Lu *et al.*, 2016; Tetreault *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020; Bertasello *et al.*, 2021). Tous ces impacts peuvent se répercuter sur la croissance des populations (Nachappa *et al.*, 2016). Cependant, les répercussions observées au niveau de la performance dans nos études étaient assez faibles par rapport à ce que nous avons anticipé : les pucerons dont l'activité des stylets était diminuée dans le phloème ont vu leur masse réduite, mais les autres traits d'histoire de vie étudiés (survie et fécondité dans la première étude, durée de développement dans la seconde) n'ont pas été significativement impactés. Cependant, dans les études décrivant des effets de la réduction de l'alimentation sur les traits d'histoire de vie des pucerons, les diminutions de l'activité phloémienne étaient beaucoup plus drastiques que ce que nous avons observé dans les nôtres (Lu *et al.*, 2016; Tetreault *et al.*, 2019; Bertasello *et al.*, 2021). Par exemple, entre des pucerons *A. pisum* soumis à *V. fabae* qui s'alimentaient pendant 2h30 et ceux sur trois hôtes génétiquement proches de *V. faba* qui montraient une quasi absence d'ingestion, une diminution du taux net de reproduction de 40 à 80 % et un allongement de la durée de la période larvaire de 13 à 26% étaient observés (Lu *et al.*, 2016). Ainsi la diminution de la durée d'ingestion de sève phloémienne enregistrée dans notre seconde étude pour les pucerons soumis à la population danoise de *M. sylvestris* (durée divisée par trois par rapport à celle des pucerons sur la référence *M. domestica* sensible) était probablement trop faible pour avoir des répercussions importantes sur la performance des pucerons, notamment en terme de fécondité. Dans le cas de notre première étude cependant, l'ordre de grandeur de la durée d'alimentation des pucerons *D. plantaginea* soumis à la variété Ariane, à savoir moins de dix minutes, était très inférieur à celui de la durée d'ingestion de sève phloémienne observée chez les pucerons soumis aux deux autres variétés de *M. domestica*, Gala et Greensleeves (environ une heure d'ingestion de sève phloémienne). Dans ce contexte, et au regard des travaux cités plus haut, on aurait pu s'attendre à observer des différences importantes de masse et/ou de durée de développement entre les pucerons élevés sur Ariane et ceux élevés sur Gala ou Greensleeves. Cependant, dans leur étude, Bogaert *et al.* (2020) n'ont pas trouvé de corrélation entre la durée de l'ingestion de sève phloémienne et la masse des pucerons. En effet, une réduction significative de biomasse était visible pour les pucerons soumis à des mutants d'*Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) L. Heynh. comparés aux pucerons soumis aux plantes non mutées malgré l'absence de différence statistique dans la phase d'ingestion de la sève phloémienne. Ceci suggère que la qualité nutritionnelle de la sève du phloème peut contribuer davantage à la biomasse des pucerons que le volume de sève ingéré.

Les effets observés sur la performance de *D. plantaginea* sur *M. domestica* et *M. sylvestris* ne sont pas aussi drastiques que ceux observés sur la variété Florina. Les études ayant porté sur le développement des colonies de *D. plantaginea* sur la variété Florina ont montré qu'en verger l'abondance de pucerons était plus faible comparée à celle de pucerons sur des variétés sensibles comme Gala (Miñarro & Dapena, 2007), ce qui suppose que les traits d'histoire de vie des pucerons sont négativement impactés par la variété Florina. En effet, sur la variété Florina et par rapport à des cultivars plus sensibles, les pucerons ont un cycle de développement prolongé, et les fondatrices ont une fécondité fortement réduite (Arnaoudov & Kutinkova, 2006). Dans notre cas, les effets observés se limitaient à une diminution de la masse des pucerons, probablement corrélée avec la réduction d'ingestion de sève phloémienne.

Dans une perspective d'utilisation de variétés résistantes de pommiers en verger, il peut être important de prendre en compte le fait que des variétés à la résistance/sensibilité contrastée soient présentes dans un même agroécosystème et puissent moduler les dynamiques d'infestation comparé aux études de laboratoire où différents cultivars sont étudiés séparément. En effet, Alhmedi *et al.* (2022), en étudiant les 13 cultivars de pommiers dans un verger unique et homogène en termes de conditions environnementales, ont mis en évidence que les cultivars les plus sensibles à *D. plantaginea* peuvent être des sources d'infestation pour des cultivars plus résistants, sur lesquels est alors observée une abondance plus importante en pucerons que s'ils avaient été seuls. Ainsi, les interactions indirectes entre cultivars sont également à prendre en compte dans l'évaluation de la résistance des plants de pommier vis-à-vis du puceron cendré *D. plantaginea*.

Le comportement alimentaire de D. plantaginea semble être un facteur explicatif des effets bottom-up des variétés de pommiers

Nos résultats montrent que les effets de la résistance des pommiers via les pucerons ont eu un effet limité sur la performance des parasitoïdes. Un allongement de la durée de développement a été observé pour les parasitoïdes se développant dans les pucerons élevés sur les variétés Ariane et Greensleeves, tandis qu'il n'y avait pas de différence significative pour le sex-ratio, la taille des tibias et le nombre d'œufs des femelles parasitoïdes. Ceci constitue donc un résultat prometteur pour le potentiel d'une utilisation combinatoire de la résistance des pommiers et de la lutte biologique dans la gestion intégrée du puceron cendré du pommier. A notre connaissance, ceci est la première étude évaluant l'effet des variétés sur le système tritrophique pommier-puceron cendré du pommier-parasitoïde. D'autres études sur d'autres systèmes tritrophiques ont décrit des répercussions minimales de la résistance de certains cultivars sur les parasitoïdes. Dans leur étude, Kalule & Wright (2005) ont testé en laboratoire l'influence de cultivars de chou commun *Brassica oleracea* (Brassicaceae) L. avec différents niveaux de résistance vis-à-vis de *Brevicoryne brassicae* (Aphididae) L. et *M. persicae* sur la performance du parasitoïde *Aphidius colemani* (Braconidae) Viereck. De manière assez similaire la durée de développement des parasitoïdes était augmentée sur certaines variétés, bien que cela ait été aussi observé sur les variétés considérées comme sensibles. Comme dans notre étude, le sex-

ratio et la taille des parasitoïdes n'ont pas été impactés par le niveau de résistance de la variété. N'ayant pas réalisé d'étude du comportement alimentaire, Kalule & Wright (2005) ont émis l'hypothèse que la différence entre variétés pouvant expliquer ce résultat serait davantage qualitative. Selon eux, la durée de développement plus longue du parasitoïde sur la variété résistante pourrait être due à des effets d'antibiose de la plante. En effet, la qualité de la nourriture consommée par un phytophage est d'une grande importance car elle modifie sa qualité en tant que ressource nutritive pour le parasitoïde, affectant ainsi le développement de ce dernier (Souissi & Rü, 1998). Par exemple, la présence de composés secondaires dans la sève ingérée par les pucerons ou un déficit en sucres et en éléments minéraux peuvent augmenter la durée de développement des parasitoïdes (Campbell & Duffey, 1979; Fuentes-Contreras & Niemeyer, 1998; Reed *et al.*, 1992). Dans notre cas nous avons mis en évidence que la résistance de la variété Ariane correspondrait plutôt à une antixénose (perturbation du comportement alimentaire mais pas d'effet sur la performance) et celle de la variété Greensleeves à de l'antibiose (perturbation légère du comportement alimentaire mais impact sur la performance). Dans les deux cas, la durée de développement des parasitoïdes ayant pour hôte les pucerons élevés sur ces deux variétés était plus longue. Ainsi, il semble que la qualité et la quantité de la sève ingérée par les pucerons peut impacter la performance des parasitoïdes. L'étude du comportement alimentaire des pucerons peut donc, dans certains cas, bien être un facteur explicatif des effets bottom-up des variétés sur le troisième niveau trophique.

Bien que nous n'ayons identifié aucun effet de la résistance des pommiers améliorant la performance des parasitoïdes, la résistance des cultures peut favoriser certains traits des parasitoïdes. Par exemple, en champ de blé, bien que les densités de pucerons et de parasitoïdes étaient significativement plus élevées chez les cultivars sensibles aux pucerons que chez les cultivars résistants, le parasitisme était significativement plus élevé chez les pucerons du cultivar résistant que chez ceux du cultivar sensible (Cai *et al.*, 2009).

Les interactions de *D. plantaginea* avec le pommier ou les parasitoïdes étudiés dans ce travail de thèse pourraient, d'après certains travaux sur d'autres modèles, être influencées par des endosymbiontes bactériens. Les symbioses intracellulaires sont très répandues chez les insectes et peuvent impacter leurs interactions avec leur plantes hôtes ainsi que leurs ennemis naturels, notamment les parasitoïdes. Un système modèle de ces symbioses est l'association obligatoire entre les pucerons et leur symbionte primaire *Buchnera aphidicola*. La bactérie apporte aux pucerons des nutriments qui ne sont pas présents dans la sève phloémienne, principalement des acides aminés essentiels (van Ham *et al.*, 2003). En plus de ce symbionte primaire, les pucerons peuvent héberger des symbiontes secondaires aux effets très divers sur leur hôte, dont sept sont décrits (pour une revue, voir Zytynska & Weisser, 2016). Parmi eux l'endosymbionte *Serratia symbiotica* peut assumer un rôle nutritionnel et présente donc une redondance fonctionnelle avec *B. aphidicola*. Le symbionte *Hamiltonella defensa* est associé à la résistance aux Hyménoptères parasitoïdes. Une étude récente conduite en Europe, Afrique du Nord et Amérique du Nord a révélé que chez *D. plantaginea* la diversité en symbiontes bactériens était extrêmement faible (Olvera-Vazquez *et al.*, 2021). En effet, *B. aphidicola* était l'espèce

bactérienne prédominante chez les pucerons *D. plantaginea* collectés dans cette étude au cours de laquelle la présence anecdotique de la bactérie *S. symbiotica* a été détectée sur huit des 186 individus échantillonnés, mais aucun des autres endosymbiontes secondaires connus n'a été retrouvé chez *D. plantaginea*. Ainsi, les interactions de *D. plantaginea* avec le pommier ou les parasitoïdes étudiés dans ce travail de thèse n'ont probablement pas été influencées par des endosymbiontes bactériens.

Enfin, les espèces du genre *Ephedrus sp.* sont les principaux parasitoïdes des pucerons cendrés du pommier *D. plantaginea* dans les vergers (Alhmedi *et al.*, 2018; Dib *et al.*, 2010) où ils peuvent également parasiter d'autres pucerons tels que les pucerons verts du pommier *A. pomi*. Ils ne parasitent cependant pas les pucerons *E. lanigerum*, qui sont les hôtes d'un parasitoïde spécialiste, *Aphelinus mali* (Aphelinidae) Haldeman. Afin de s'assurer que la résistance des pommiers n'affecte pas la régulation naturelle des pucerons ravageurs de pommiers par les parasitoïdes, il faudrait donc répliquer cette étude sur le système tritrophique pommier/ *E. lanigerum* /*A. mali*.

La structure génétique des populations de M. sylvestris semble être faiblement corrélée au comportement alimentaire de D. plantaginea

Dans la seconde étude de ce chapitre, nous avons mis en évidence un lien entre la structure génétique des populations de *M. sylvestris* et le comportement alimentaire de *D. plantaginea*. A notre connaissance, une seule autre étude a essayé de mettre en lien la structure génétique des populations d'une plante avec la performance d'un ravageur. Parent *et al.* (2017) ont montré que l'accumulation d'acétophénones chez l'épinette blanche *Picea glauca* (Pinaceae) Voss était un mécanisme de résistance efficace contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette *Choristoneura fumiferana* (Tortricidae) Clemens et que la structure des populations de *P. glauca* était corrélée avec ce trait de résistance. Il semble que *C. fumiferana* ait affecté la structure des populations de *P. glauca* du fait de sa pression sur les plantes. La température était un autre facteur explicatif de la structure génétique ; en effet, cette dernière peut jouer un rôle important dans la survie de *P. glauca* et *C. fumiferana* (Kramer *et al.*, 2000). De plus chez l'épicéa commun *Picea abies* (Pinaceae) H. Karst, une espèce proche de *P. glauca*, le taux de composés phénoliques est négativement corrélé avec la température (Rummukainen *et al.*, 2007). En ce qui concerne *M. sylvestris*, certains composés comme les glycosides d'acide ascorbique dans les fruits sont en plus grandes concentrations par rapport à *M. domestica* (Richardson *et al.*, 2020). Dans la mesure où les acides ascorbiques sont corrélés à la résistance vis-à-vis de *D. plantaginea* chez *M. domestica* (Berrueta *et al.*, 2018), une différence de concentrations de ces composés peut modifier la pression de sélection exercée par *D. plantaginea* ce qui peut participer à la structure des populations de *M. sylvestris*. Enfin, l'histoire évolutive liée à la recolonisation de l'Europe par *M. sylvestris* suite à la dernière période glaciaire (Cornille *et al.*, 2013) semble être un élément majeur de la structure génétique des populations de *M. sylvestris*.

L'introgession de gènes de *M. domestica* est décrite pour toutes ses espèces sauvages proches, telles que *M. sieversii*, *Malus orientalis* (Rosaceae) Uglitz. (Gross *et al.*, 2012), et plus particulièrement *M. sylvestris* (Cornille *et al.*, 2015). En Europe, les activités humaines, par la production de pommes, et les perturbations humaines, par les modifications de la diversité des pollinisateurs, ont eu un impact significatif sur les taux d'introgession interspécifique entre les cultures et les pommiers sauvages. Étonnamment nous avons mis en évidence que cette introgession pouvait augmenter la résistance des hybrides *M. sylvestris* - *M. domestica* vis-à-vis du puceron *D. plantaginea*. À notre connaissance, les effets sur la résistance des plantes sauvages du fait des flux de gènes domestiques – sauvages ont largement été décrits pour les plantes génétiquement modifiées (par exemple, Jenczewski *et al.*, 2003; Lu, 2013), mais aucune étude n'a porté sur l'effet de l'introgession de cultures non transgéniques sur la résistance des espèces sauvages. Ainsi, d'autres études avec un nombre plus important d'hybrides répartis sur chaque population seraient nécessaires pour trancher sur les effets de l'introgession sur la résistance vis-à-vis du puceron cendré du pommier. Compte tenu de l'amplitude de ce phénomène en Europe et de l'utilité de *M. sylvestris* en tant que ressource pour les futurs programmes de sélection (Cornille *et al.*, 2013), des mesures de conservation devraient donc être envisagées.

Conclusion générale

Dans ce travail de thèse, nous souhaitons évaluer l'efficacité de différentes méthodes de contrôle des Hémiptères phloémophages ravageurs de vergers via leur impact sur le comportement alimentaire. Ceci amène deux questions : 1- dans quelle mesure la méthode de protection des cultures étudiée perturbe-t-elle le comportement alimentaire de l'Hémiptère phloémophage et 2- est-ce-que cette perturbation et ses conséquences pourraient permettre de contrôler le ravageur en vergers, sans toutefois impacter la régulation par les ennemis naturels ?

Les huiles essentielles ont engendré une perturbation du comportement alimentaire quel que soit le mode d'exposition, par inhalation ou ingestion. Ces effets étaient contrastés selon le mode d'application (par diffusion dans l'air ou par injection dans le tronc) mais aussi suivant l'insecte ciblé (*D. plantaginea* ou *C. pyri*). L'altération observée suite à l'inhalation des huiles essentielles semblait globalement trop faible d'un point de vue agronomique pour permettre de contrôler efficacement les colonies de *D. plantaginea* et *C. pyri*. De plus, les COV des huiles essentielles n'ont pas permis d'empêcher la localisation de leur plante hôte par ces deux ravageurs. L'exposition par ingestion des ravageurs aux huiles essentielles semble plus prometteuse, car même si l'impact sur le comportement alimentaire de *C. pyri* était limité, une mortalité accrue pour les deux espèces d'Hémiptères a été observée sur les arbres injectés comparés aux arbres non injectés. Pour valider l'intérêt de cette technique pour la protection des vergers, il est cependant nécessaire d'évaluer les éventuels effets de l'injection des huiles essentielles sur les auxiliaires : la modification du profil des COV émis par les plantes injectées, notamment liée à l'émission de composés répulsifs, peut probablement impacter le comportement de localisation des pollinisateurs et des ennemis naturels. Aussi, l'ingestion de composés toxiques par les pucerons et psylles peut potentiellement nuire à leurs parasitoïdes, en induisant une mortalité accrue des larves se développant dans des hôtes soumis aux arbres injectés.

Nous avons mis en avant que les lipopeptides bactériens extraits de *Bacillus sp.* et plus particulièrement les Surfactines ont un effet aphicide avéré, et ce sur les deux espèces de pucerons sur lesquelles ils ont été testés, *D. plantaginea* et *A. fabae*. Cependant, les effets sublétaux de l'exposition aux Surfactines sur le comportement alimentaire des pucerons se sont avérés contradictoires : la durée d'ingestion de sève phloémienne était augmentée pour les pucerons *D. plantaginea* ayant survécu à l'exposition aux lipopeptides, tandis qu'elle était réduite pour les pucerons *A. fabae* survivants. La possible augmentation de la durée d'alimentation des pucerons suite à l'exposition aux lipopeptides peut être un frein à leurs utilisations : les insectes survivants pourraient avoir une meilleure fitness, et dans le cadre d'utilisation des lipopeptides sur d'autres systèmes, les survivants auraient ainsi une plus grande probabilité d'inoculer des phytovirus. A l'inverse, l'absence d'effet de l'exposition des pucerons sur le comportement de sélection de l'hôte par les femelles parasitoïdes semblait indiquer que l'utilisation de biopesticides et le contrôle biologique par les parasitoïdes ne sont

pas antagonistes. Il faudrait cependant étudier les effets des lipopeptides sur les performances des parasitoïdes développés dans des hôtes exposés ainsi que les effets directs des lipopeptides sur les parasitoïdes pour pouvoir trancher sur ce point.

Nous avons montré qu'il était possible de faire un lien entre le comportement alimentaire et l'effet bottom-up des variétés de *M. domestica* sur les parasitoïdes : ces derniers avaient une durée de développement augmentée lorsqu'il se développaient dans des pucerons qui avaient été soumis aux variétés sur lesquelles une diminution de l'activité des stylets des pucerons était observée. Malgré tout, l'augmentation de la durée de développement était relativement faible, ce qui indiquerait que dans le cadre de la protection des cultures, la résistance des pommiers n'aurait pas d'effet négatif sur la régulation des pucerons par les parasitoïdes. Cela reste cependant à valider dans la mesure où certains paramètres comme le taux de parasitisme ou la mortalité durant le développement déterminent l'efficacité du contrôle biologique par les parasitoïdes mais n'ont pas été pris en compte dans notre étude. Nous n'avons pas non plus incorporé dans notre étude le gradient complet de résistance des cultivars de *M. domestica* vis-à-vis de *D. plantaginea*. En effet, une mortalité très élevée et un développement lent des populations (taux d'accroissement) et des individus (durée de développement) sont observés dans la littérature sur la variété Florina, ce qui d'un point de vue expérimental n'aurait pas permis d'obtenir la quantité de pucerons nécessaire pour pouvoir étudier le niveau trophique supérieur. Par ailleurs nous avons montré qu'un lien semblait exister entre la structure génétique du pommier sauvage européen *M. sylvestris* et le comportement alimentaire de *D. plantaginea*. Nous avons donc mis en avant le fait que la recherche de facteurs de résistances chez les espèces sauvages proches des cultures devrait également prendre en compte les populations de ces espèces sauvages de pommier. Cependant, tandis que le phénomène de domestication est globalement corrélé à une diminution de la résistance des cultures du fait de la sélection (Moreira *et al.*, 2018), la fécondité et la survie de *D. plantaginea* n'étaient pas différentes lorsqu'ils étaient soumis à *M. domestica* comparé aux différentes populations de *M. sylvestris* : *M. sylvestris* ne semble donc pas constituer une source exploitable de traits de résistance vis-à-vis de *D. plantaginea*.

Les différents leviers étudiés dans le cadre de cette thèse ont donc eu des effets contrastés sur le comportement alimentaire des Hémiptères phloémophages étudiés, ainsi que sur leur performance. Dans la mesure où il semble difficile d'utiliser un seul levier agronomique pour contrôler ces ravageurs, leur mise en pratique dans le cadre de la protection intégrée des cultures doit se baser sur l'intégration des différentes méthodes de contrôle. La combinaison de contrôle biologique par lâchers ennemis naturels et de traitements insecticides sélectifs dans les programmes de lutte intégrée peuvent fournir un contrôle optimal des ravageurs (Arnó & Gabarra, 2011; Torres & Bueno, 2018). Dans certaines études, les ennemis naturels utilisés dans la lutte biologique se sont même avérés plus efficaces lorsqu'ils étaient associés à des applications sélectives d'insecticides (Bompard *et al.*, 2013). Des approches de modélisation peuvent optimiser la combinaison des lâchers d'ennemis naturels et des traitements de pesticides (Tang *et al.*, 2010). Les insectes soumis à des plantes résistantes ont souvent une sensibilité plus importante aux pesticides de synthèse et aux biopesticides, qui s'observe par des doses létales 50 plus faibles pour les insectes sur les variétés résistantes comparés à ceux

sur les variétés sensibles (Meade & Hare, 1995; Yin *et al.*, 2008). Le fait que Meade & Hare (1995) aient décelé un effet additif de l'utilisation de biopesticides (traitements à base de *B. thuringiensis*) avec la résistance des plantes dans la lutte contre les ravageurs est encourageant pour l'utilisation de lipopeptides. Dans la mesure où les pesticides de synthèse ont de nombreux inconvénients (pollution, effets sur les organismes non cibles et sur la santé des agriculteurs), l'utilisation de biopesticides constitue une alternative pour une transition vers des systèmes s'affranchissant de traitements. Ainsi, la recherche sur les effets combinatoires des méthodes de protection des cultures devrait à l'avenir davantage se concentrer sur les biopesticides tels que les lipopeptides. Les combinaisons de la résistance des plantes et de l'utilisation d'insecticides peuvent cependant donner des résultats contradictoires : dans leur étude Verkerk & Wright (1996) ont montré que sur des plantes hôtes avec un certain degré de résistance vis-à-vis des ravageurs, la toxicité des insecticides pouvait être soit augmentée, soit diminuée par rapport aux plantes très sensibles. Wangari Nderitu *et al.* (2020) ont évalué l'effet combiné de la résistance de cultivars de tomate, de l'utilisation de pesticides sélectifs et de contrôle biologique dans le contrôle de la mineuse sud-américaine de la tomate *Tuta absoluta* (Gelechiidae) Meyrick en serre. En combinaison avec des traitements insecticides, l'introduction d'ennemis naturels a amélioré le contrôle de *T. absoluta* sur la variété sensible. Cependant, sur la variété modérément résistante, aucune différence n'était observée quant au contrôle de *T. absoluta* entre la modalité avec les traitements pesticides seuls et celle où des ennemis naturels ont été introduits en combinaison avec les pesticides. Il est donc important d'étudier les interactions entre les différentes méthodes de contrôle pour déterminer quelle approche combinatoire permet d'aboutir au contrôle le plus efficace des ravageurs. En ce qui concerne l'utilisation d'huiles essentielles (pour leurs propriétés insecticides) conjointement à des pesticides, au-delà d'un simple effet additif des deux types de produits (Bhuiyan *et al.*, 2001; Khorrami *et al.*, 2018; Mantzoukas *et al.*, 2020), des effets synergiques peuvent être observés sur la mortalité induite chez les ravageurs (pour une synthèse bibliographique sur le sujet : Dassanayake *et al.*, 2021). L'effet synergique semble être lié au fait que les huiles essentielles peuvent affecter les concentrations ou activités de différentes enzymes chez les ravageurs (El-Meniawi & Seham, 2006; Kumrungsee *et al.*, 2014). L'efficacité de la combinaison des traitements pesticides, de l'utilisation d'huiles essentielles et le recours au contrôle biologique est donc évaluée sur les effets additifs ou synergiques de l'association de ces pratiques sur la mortalité des ravageurs. Il pourrait cependant être intéressant de regarder les effets combinés des différents leviers proposés dans ce travail de thèse sur la colonisation de la plante hôte par les Hémiptères phytophages. Comme cela a été détaillé plus haut, l'induction des défenses des pommiers suite à une infestation variait entre les variétés, certains gènes étant exprimés chez les variétés résistantes comparé aux variétés sensibles (Qubbaj *et al.*, 2005). La combinaison de la résistance des plantes et de l'injection d'huile essentielle pourrait donc aboutir à une perturbation du comportement alimentaire plus forte que si elles étaient utilisées séparément, du fait des effets directs de chacune (antiappétance de l'huile essentielle et perturbation issue de la résistance de la plante) mais aussi du fait de l'effet indirect de l'huile

essentielle (induction de la défense induite plus importante que chez une plante sensible). Dans nos deux études les effets sublétaux de l'exposition aux Surfactines pouvaient aboutir soit à une augmentation soit à une diminution de l'ingestion de sève phloémienne chez les pucerons survivants. Il serait intéressant d'évaluer si la résistance des plantes peut dans le premier cas augmenter les effets négatifs sur le comportement alimentaire, et dans le second cas neutraliser l'augmentation de l'alimentation chez les survivants.

Références bibliographiques

- Abbassy, M.A., Abdelgaleil, S.A.M., Rabie, R.Y.A., 2009. Insecticidal and synergistic effects of *Majorana hortensis* essential oil and some of its major constituents. *Entomol. Exp. Appl.* 131, 225–232. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2009.00854.x>
- Aboalfayah, R., Samara, R., 2022. Antifeedants Impact of Plant Essential Oil on Green Peach Aphid on Potato Crops. *J. Ecol. Eng.* 23, 274–285. <https://doi.org/10.12911/22998993/143976>
- Agrawal, A.A., 2011. Current trends in the evolutionary ecology of plant defence: Plant defence theory. *Funct. Ecol.* 25, 420–432. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01796.x>
- Alhmedi, A., Bylemans, D., Bangels, E., Beliën, T., 2022. Cultivar-mediated effects on apple–*Dysaphis plantaginea* interaction. *J. Pest Sci.* 95, 1303–1315. <https://doi.org/10.1007/s10340-021-01460-6>
- Alhmedi, A., Raymaekers, S., Tomanović, Ž., Bylemans, D., Beliën, T., 2018. Food web structure of aphids and their parasitoids in Belgian fruit agroecosystems. *Entomol. Sci.* 21, 279–291. <https://doi.org/10.1111/ens.12303>
- Alix, A., Cortesero, A.M., Nénon, J.P., Anger, J.P., 2001. Selectivity assessment of chlorfenvinphos reevaluated by including physiological and behavioral effects on an important beneficial insect. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2530–2536. <https://doi.org/10.1002/etc.5620201119>
- Alvarez, A.E., Tjallingii, W.F., Garzo, E., Vleeshouwers, V., Dicke, M., Vosman, B., 2006. Location of resistance factors in the leaves of potato and wild tuber-bearing *Solanum* species to the aphid *Myzus persicae*. *Entomol. Exp. Appl.* 121, 145–157. <https://doi.org/10.1111/j.1570-8703.2006.00464.x>
- Alyokhin, A., Chen, Y.H., 2017. Adaptation to toxic hosts as a factor in the evolution of insecticide resistance. *Curr. Opin. Insect Sci., Pests and resistance * Behavioural ecology* 21, 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.04.006>
- Ameline, A., Dorland, J., Werrie, P.-Y., Couty, A., Fauconnier, M.-L., Lateur, M., Doury, G., 2022. *Geranium macrorrhizum*, a potential novel companion plant affecting preference and performance of *Myzus persicae* on sweet pepper. *J. Pest Sci.* <https://doi.org/10.1007/s10340-022-01522-3>
- Angeli, G., Simoni, S., 2006. Apple cultivars acceptance by *Dysaphis plantaginea* Passerini (Homoptera: Aphididae). *J. Pest Sci.* 79, 175–179. <https://doi.org/10.1007/s10340-006-0129-6>
- Ardestanirostami, H., Sheikhiarjan, A., Arbab, A., Javadzade, M., 2016. Control of pear psylla, *Cacopsylla pyricola* by trunk injection of azadirachtin and complete fertilizer. *Iran. J. Plant Prot. Sci.* 47.
- Arnaoudov, V., Kutinkova, H., 2006. Infestation by the rosy apple aphid (*Dysaphis plantaginea* PASS., Homoptera: Aphididae). *J. Fruit Ornam Plant Res, J. Fruit Ornam. Plant Res.* 14, 137–142.
- Arnó, J., Gabarra, R., 2011. Side effects of selected insecticides on the *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) predators *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis* (Hemiptera: Miridae). *J. Pest Sci.* 84, 513–520. <https://doi.org/10.1007/s10340-011-0384-z>
- Assié, L.K., Deleu, M., Arnaud, L., Paquot, M., Thonart, P., Gaspar, C., Haubruge, E., 2002. Insecticide activity of surfactins and iturins from a biopesticide *Bacillus subtilis* Cohn (S499 strain). *Meded. Rijksuniv. Te Gent Fak. Van Landbouwk. En Toegepaste Biol. Wet.* 67, 647–655.

- Auclair, J.L., 1959. Feeding and Excretion by the Pea Aphid, *Acyrtosiphon Pisum* (harr.) (homoptera: Aphididae), Reared on Different Varieties of Peas. *Entomol. Exp. Appl.* 2, 279–286. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1959.tb00441.x>
- Backus, E.A., Habibi, J., Yan, F., Ellersieck, M., 2005a. Stylet Penetration by Adult *Homalodisca coagulata* on Grape: Electrical Penetration Graph Waveform Characterization, Tissue Correlation, and Possible Implications for Transmission of *Xylella fastidiosa*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 98, 787–813. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2005\)098\[0787:SPBAHC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2005)098[0787:SPBAHC]2.0.CO;2)
- Backus, E.A., Serrano, M.S., Ranger, C.M., 2005b. Mechanisms of Hopperburn: An Overview of Insect Taxonomy, Behavior, and Physiology. *Annu. Rev. Entomol.* 50, 125–151. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123310>
- Badenes, M.L., Byrne, D.H., 2012. *Fruit Breeding*. Springer Science & Business Media.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Baldwin, I.T., Preston, C.A., 1999. The eco-physiological complexity of plant responses to insect herbivores. *Planta* 208, 137–145. <https://doi.org/10.1007/s004250050543>
- Bálint, J., Thiesz, R., Nyárádi, I.-I., Szabó, K.-A., 2013. Field Evaluation of Traditional Apple Cultivars to Induced Diseases and Pests. *Not Bot Hort Agrobot Cluj* 41, 238. <https://doi.org/10.15835/nbha4119004>
- Banks, C.J., Macaulay, E.D.M., 1964. The feeding, growth and reproduction of *Aphis fabae* Scop. on Viciu fuba under experimental conditions. *Ann. Appl. Biol.* 53, 229–242. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1964.tb03797.x>
- Baser, K.H.C., Buchbauer, G. (Eds.), 2009. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. CRC Press, Boca Raton. <https://doi.org/10.1201/9781420063165>
- Baudry, X., Géraldine, D., Couty, A., Fourdrain, Y., Van Havermaet, R., Lateur, M., Ameline, A., 2021. Antagonist effects of the leek *Allium porrum* as a companion plant on aphid host plant colonization. *Sci. Rep.* 11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83580-8>
- Beeman, R.W., Matsumura, F., 1978. Anorectic Effect of Chlordimeform in the American Cockroach. *J. Econ. Entomol.* 71, 859–861. <https://doi.org/10.1093/jee/71.6.859>
- Ben Issa, R., Gautier, H., Costagliola, G., Gomez, L., 2016. Which companion plants affect the performance of green peach aphid on host plants? Testing of 12 candidate plants under laboratory conditions. *Entomol. Exp. Appl.* 160, 164–178. <https://doi.org/10.1111/eea.12473>
- Ben Issa, R., Gautier, H., Gomez, L., 2017. Influence of neighbouring companion plants on the performance of aphid populations on sweet pepper plants under greenhouse conditions. *Agric. For. Entomol.* 19, 181–191. <https://doi.org/10.1111/afe.12199>
- Ben Issa, R.B., Gomez, L., Sauge, M.H., Gautier, H., 2012. Effects of companion plants on the behavior of the green peach aphid reared on pepper plants. *IOBC/WPRS Bulletin* 75, 29–33.
- Ben Khedher, S., Boukedi, H., Dammak, M., Kilani-Feki, O., Sellami-Boudawara, T., Abdelkefi-Mesrati, L., Tounsi, S., 2017. Combinatorial effect of *Bacillus amyloliquefaciens* AG1 biosurfactant and *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 toxin on *Spodoptera littoralis* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 144, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.01.006>
- Ben Khedher, S., Boukedi, H., Kilani-Feki, O., Chaib, I., Laarif, A., Abdelkefi-Mesrati, L., Tounsi, S., 2015. *Bacillus amyloliquefaciens* AG1 biosurfactant: Putative receptor diversity and histopathological effects on *Tuta absoluta* midgut. *J. Invertebr. Pathol.* 132, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.08.010>

- Berrueta, L.A., Sasià-Arriba, A., Miñarro, M., Antón, M.J., Alonso-Salces, R.M., Micheletti, D., Gallo, B., Dapena, E., 2018. Relationship between hydroxycinnamic acids and the resistance of apple cultivars to rosy apple aphid. *Talanta* 187, 330–336.
- Bertasello, L.E.T., Carmo-Sousa, M., Prado Maluta, N.K., Rossini Pinto, L., Spotti Lopes, J.R., Gonçalves, M.C., 2021. Effect of Sugarcane Cultivars Infected with Sugarcane Yellow Leaf Virus (ScYLV) on Feeding Behavior and Biological Performance of *Melanaphis sacchari* (Hemiptera: Aphididae). *Plants* 10, 2122. <https://doi.org/10.3390/plants10102122>
- Bharti, G., Prasad, S., Upadhyay, V.B., 2013. The Influence of Plant Volatile of *Allium sativum* on the Reproductive Ability of Multivoltine Mulberry Silkworm *Bombyx mori* Linn. *African J. Basic & Appl. Sci.* 5, 242–249.
- Bhuiyan, K.R., Hassan, E., Isman, M.B., 2001. Growth inhibitory and lethal effects of some botanical insecticides and potential synergy by dillapiol in *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Plant Dis. Prot.* 108, 82–88.
- Birkett, M.A., Campbell, C.A.M., Chamberlain, K., Guerrieri, E., Hick, A.J., Martin, J.L., Matthes, M., Napier, J.A., Pettersson, J., Pickett, J.A., Poppy, G.M., Pow, E.M., Pye, B.J., Smart, L.E., Wadhams, G.H., Wadhams, L.J., Woodcock, C.M., 2000. New roles for *cis*-jasmone as an insect semiochemical and in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 9329–9334. <https://doi.org/10.1073/pnas.160241697>
- Blackman, R.L., Eastop, V.F., 2000. *Aphids on the World's Crops: An Identification and Information Guide*, 2nd Edition | Wiley.
- Blatt, S., Hiltz, K., 2021. A New Look at Cultivar Preference in *Hoplocampa testudinea* (Hymenoptera: Tenthredinidae) on Apple in the Annapolis Valley of Nova Scotia, Canada. *Insects* 12, 769. <https://doi.org/10.3390/insects12090769>
- Bogaert, F., Marmonier, A., Pichon, E., Boissinot, S., Ziegler-Graff, V., Chesnais, Q., Villeroy, C., Drucker, M., Brault, V., 2020. Impact of Mutations in *Arabidopsis thaliana* Metabolic Pathways on Polerovirus Accumulation, Aphid Performance, and Feeding Behavior. *Viruses* 12, 146. <https://doi.org/10.3390/v12020146>
- Boissot, N., Pavis, C., Guillaume, R., Lafortune, D., Sauvion, N., 2000. Insect resistance in *Cucumis melo* accession 90625. *Acta Hortic.* 297–304. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2000.510.49>
- Bompard, A., Jaworski, C.C., Bearez, P., Desneux, N., 2013. Sharing a predator: can an invasive alien pest affect the predation on a local pest? *Popul. Ecol.* 55, 433–440. <https://doi.org/10.1007/s10144-013-0371-8>
- Bonani, J.P., Fereres, A., Garzo, E., Miranda, M.P., Appezzato-Da-Gloria, B., Lopes, J.R.S., 2010. Characterization of electrical penetration graphs of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in sweet orange seedlings. *Entomol. Exp. Appl.* 134, 35–49. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2009.00937.x>
- Boutin, A., Fogelgesang, J.-F., Beaux, J.-F., Ribola, F., 2010. *Atlas de Biologie végétale BCPST 1re et 2e années.*, Dunod, Paris. ed.
- Bras, A., Roy, A., Heckel, D.G., Anderson, P., Karlsson Green, K., 2022. Pesticide resistance in arthropods: Ecology matters too. *Ecol. Lett.* 25, 1746–1759. <https://doi.org/10.1111/ele.14030>
- Brown, M.W., Glenn, D.M., Wisniewski, M.E., 1991. Functional and Anatomical Disruption of Apple Roots by the Woolly Apple Aphid (Homoptera: Aphididae). *J. Econ. Entomol.* 84, 1823–1826. <https://doi.org/10.1093/jee/84.6.1823>
- Bruce, T.J., Birkett, M.A., Blande, J., Hooper, A.M., Martin, J.L., Khambay, B., Prosser, I., Smart, L.E., Wadhams, L.J., 2005. Response of economically important aphids to components of *Hemizygia petiolata* essential oil. *Pest Manag. Sci.* 61, 1115–1121. <https://doi.org/10.1002/ps.1102>

- Bruce, T.J.A., Wadhams, L.J., Woodcock, C.M., 2005. Insect host location: a volatile situation. *Trends Plant Sci.* 10, 269–274. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.04.003>
- Bukovinszky, T., Gols, R., Smid, H.M., Bukovinszkiné Kiss, G., Dicke, M., Harvey, J.A., 2012. Consequences of constitutive and induced variation in the host's food plant quality for parasitoid larval development. *J. Insect Physiol.* 58, 367–375. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.12.017>
- Cai, Q.-N., Ma, X.-M., Zhao, X., Cao, Y.-Z., Yang, X.-Q., 2009. Effects of host plant resistance on insect pests and its parasitoid: A case study of wheat-aphid–parasitoid system. *Biol. Control* 49, 134–138. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.12.009>
- Caillaud, C.M., Pierre, J.S., Chaubet, B., Di Pietro, J.P., 1995. Analysis of wheat resistance to the cereal aphid *Sitobion avenae* using electrical penetration graphs and flow charts combined with correspondence analysis. *Entomol. Exp. Appl.* 75, 9–18. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1995.tb01904.x>
- Camacho-Coronel, X., Molina-Torres, J., Heil, M., 2020. Sequestration of Exogenous Volatiles by Plant Cuticular Waxes as a Mechanism of Passive Associational Resistance: A Proof of Concept. *Front. Plant Sci.* 11.
- Campbell, B.C., Duffey, S.S., 1979. Tomatine and Parasitic Wasps: Potential Incompatibility of Plant Antibiosis with Biological Control. *Science* 205, 700–702. <https://doi.org/10.1126/science.205.4407.700>
- Chapman, R.F., Bernays, E.A., Simpson, S.J., 1981. Attraction and repulsion of the aphid, *Cavariella aegopodii*, by Plant Odors. *J. Chem. Ecol.* 7, 881–888. <https://doi.org/10.1007/BF00992385>
- Chaubey, M.K., 2014. Biological activities of *Allium sativum* essential oil against pulse beetle, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). *Herba Pol.* 60, 41–55. <https://doi.org/10.2478/hepo-2014-0009>
- Chen, C., Liu, C.-H., Cai, J., Zhang, W., Qi, W.-L., Wang, Z., Liu, Z.-B., Yang, Y., 2018. Broad-spectrum antimicrobial activity, chemical composition and mechanism of action of garlic (*Allium sativum*) extracts. *Food Control* 86, 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.015>
- Chen, X., Avia, K., Forler, A., Remoué, C., Venon, A., Rousselet, A., Lucas, G., Kwarteng, A.O., Rover, R., Le Guilloux, M., Belcram, H., Combes, V., Corti, H., Vazquez, S., Falque, M., Alins, G., Kirisits, T., Ursu, T.M., Roman, A., Volk, G.M., Bazot, S., Cornille, A., 2022. Ecological and evolutionary drivers of phenotypic and genetic variation in the European crabapple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.), a wild relative of the cultivated apple. HAL CCSD.
- Chesnais, Q., 2016. Intégration de la Cameline au sein des agro-écosystèmes : des relations multi-trophiques complexes. Thèse de doctorat, Université de Picardie Jules Verne Amiens.
- Chesnais, Q., Ameline, A., Géraldine, D., Vincent, L.R., Couty, A., 2015. Aphid Parasitoid Mothers Don't Always Know Best through the Whole Host Selection Process. *PLoS ONE* 10, e0135661.
- Chesnais, Q., Caballero Vidal, G., Coquelle, R., Yvon, M., Mauck, K., Brault, V., Ameline, A., 2020. Post-acquisition effects of viruses on vector behavior are important components of manipulation strategies. *Oecologia* 194, 429–440. <https://doi.org/10.1007/s00442-020-04763-0>
- Chesnais, Q., Mauck, K.E., 2018. Choice of Tethering Material Influences the Magnitude and Significance of Treatment Effects in Whitefly Electrical Penetration Graph Recordings. *J. Insect Behav.* 31, 656–671. <https://doi.org/10.1007/s10905-018-9705-x>

- Chevreau, E., Brisset, M.N., Paulin, J.P., James, D.J., 1998. Fire blight resistance and genetic trueness-to-type of four somaclonal variants from the apple cultivar Greensleeves. *Euphytica* 104, 199–205.
- Cho, S.-R., Koo, H.-N., Yoon, C., Kim, G.-H., 2011. Sublethal effects of flonicamid and thiamethoxam on green peach aphid, *Myzus persicae* and feeding behavior analysis. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 54, 889–898. <https://doi.org/10.1007/BF03253177>
- Civolani, S., Leis, M., Grandi, G., Garzo, E., Pasqualini, E., Musacchi, S., Chicca, M., Castaldelli, G., Rossi, R., Freddy Tjallingii, W., 2011. Stylet penetration of *Cacopsylla pyri*; an electrical penetration graph (EPG) study. *J. Insect Physiol.* 57, 1407–1419. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.07.008>
- Conchou, L., Lucas, P., Meslin, C., Proffit, M., Staudt, M., Renou, M., 2019. Insect Odorscapes: From Plant Volatiles to Natural Olfactory Scenes. *Front. Physiol.* 10, 972. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00972>
- Cornille, A., Feurtey, A., Gélin, U., Ropars, J., Misvanderbrugge, K., Gladieux, P., Giraud, T., 2015. Anthropogenic and natural drivers of gene flow in a temperate wild fruit tree: A basis for conservation and breeding programs in apples. *Evol. Appl.* 8, 373–384. <https://doi.org/10.1111/eva.12250>
- Cornille, A., Giraud, T., Bellard, C., Tellier, A., Le Cam, B., Smulders, M.J.M., Kleinschmit, J., Roldan-Ruiz, I., Gladieux, P., 2013. Postglacial recolonization history of the European crabapple (*Malus sylvestris* Mill.), a wild contributor to the domesticated apple. *Mol. Ecol.* 22, 2249–2263. <https://doi.org/10.1111/mec.12231>
- Cornille, Amandine, Giraud, T., Smulders, M.J.M., Roldán-Ruiz, I., Gladieux, P., 2013. The domestication and evolutionary ecology of apples. *Trends Genet. TIG* 30, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.10.002>
- Crompton, D.S., Ode, P.J., 2010. Feeding Behavior Analysis of the Soybean Aphid (Hemiptera: Aphididae) on Resistant Soybean ‘Dowling.’ *J. Econ. Entomol.* 103, 648–653.
- Cruz, G.S., Wanderley-Teixeira, V., Oliveira, J.V., Lopes, F.S.C., Barbosa, D.R.S., Breda, M.O., Dutra, K.A., Guedes, C.A., Navarro, D.M.A.F., Teixeira, A.A.C., 2016. Sublethal Effects of Essential Oils From *Eucalyptus staigeriana* (Myrtales: Myrtaceae), *Ocimum gratissimum* (Lamiales: Lamiaceae), and *Foeniculum vulgare* (Apiales: Apiaceae) on the Biology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 109, 660–666. <https://doi.org/10.1093/jee/tow005>
- Cuadra, P., Harborne, J.B., Waterman, P.G., 1997. Increases in surface flavonols and photosynthetic pigments in *Gnaphalium luteoalbum* in response to UV-B radiation. *Phytochemistry* 45, 1377–1383. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00183-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00183-0)
- Cui, L., Sun, L., Shao, X., Cao, Y., Yang, D., Li, Z., Yuan, H., 2010. Systemic action of novel neonicotinoid insecticide IPP-10 and its effect on the feeding behaviour of *Rhopalosiphum padi* on wheat. *Pest Manag. Sci.* 66, 779–785. <https://doi.org/10.1002/ps.1942>
- Dahlin, I., Vucetic, A., Ninkovic, V., 2015. Changed host plant volatile emissions induced by chemical interaction between unattacked plants reduce aphid plant acceptance with intermorph variation. *J Pest Sci* 88, 249–257. <https://doi.org/10.1007/s10340-014-0625-z>
- Dancewicz, K., Gabrys, B., Przybylska, M., 2011. Effect of garlic (*Allium sativum* L.) and tansy (*Tanacetum vulgare* L.) extracts and potassic horticultural soap on the probing and feeding behaviour of *Myzus persicae* (Sulzer, 1776). *Aphids Homopterous Insects* 17, 126–136.
- Dancewicz, K., Sznajder, K., Załuski, D., Kordan, B., Gabryś, B., 2016. Behavioral sensitivity of *Myzus persicae* to volatile isoprenoids in plant tissues. *Entomol. Exp. Appl.* 160, 229–240. <https://doi.org/10.1111/eea.12480>

- Dardeau, F., Deprost, E., Laurans, F., Lainé, V., Lieutier, F., Sallé, A., 2014. Resistant poplar genotypes inhibit pseudogall formation by the wooly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* Sign. *Trees* 28, 1007–1019. <https://doi.org/10.1007/s00468-014-1014-1>
- Dardouri, T., Gautier, H., Ben Issa, R., Costagliola, G., Gomez, L., 2019. Repellence of *Myzus persicae* (Sulzer): evidence of two modes of action of volatiles from selected living aromatic plants. *Pest Manag. Sci.* 75, 1571–1584. <https://doi.org/10.1002/ps.5271>
- Dardouri, T., Gomez, L., Ameline, A., Costagliola, G., Schoeny, A., Gautier, H., 2021. Non-host volatiles disturb the feeding behavior and reduce the fecundity of the green peach aphid, *Myzus persicae*. *Pest Manag. Sci.* 77, 1705–1713. <https://doi.org/10.1002/ps.6190>
- Darling, D., n.d. Hemiptera [WWW Document]. URL <http://www.daviddarling.info/encyclopedia/H/Hemiptera.html> (accessed 10.3.22).
- Das, S.K., 2013. Mode of action of pesticides and the novel trends – A critical review. *Int. Res. J. Agric. Soil Sci.* 3, 393–401. <https://doi.org/10.14303/irjas.2013.118>
- Dassanayake, M.K., Chong, C.H., Khoo, T.-J., Figiel, A., Szumny, A., Choo, C.M., 2021. Synergistic Field Crop Pest Management Properties of Plant-Derived Essential Oils in Combination with Synthetic Pesticides and Bioactive Molecules: A Review. *Foods* 10, 2016. <https://doi.org/10.3390/foods10092016>
- De Zutter, N., Audenaert, K., Ameye, M., Haesaert, G., Smagghe, G., 2016. Effect of the mycotoxin deoxynivalenol on grain aphid *Sitobion avenae* and its parasitic wasp *Aphidius ervi* through food chain contamination. *Arthropod-Plant Interact.* 10, 323–329. <https://doi.org/10.1007/s11829-016-9432-1>
- Déla, M.A., Koffivi, K.G., Komina, A., Arnaud, A., Philippe, G., Adolé, G.I., 2014. Evaluation of neem leaves-based preparations as insecticidal agents against the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sternorrhyncha: Aphididae). *African Journal of Agricultural Research* 9, 1344–1352.
- Delpuech, J.M., Meyet, J., 2003. Reduction in the Sex Ratio of the Progeny of a Parasitoid Wasp (*Trichogramma brassicae*) Surviving the Insecticide Chlorpyrifos. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45, 203–208. <https://doi.org/10.1007/s00244-002-0146-2>
- Denoirjean, T., Ameline, A., Couty, A., Dubois, F., Coutte, F., Doury, G., 2022. Effects of surfactins, *Bacillus* lipopeptides, on the behavior of an aphid and host selection by its parasitoid. *Pest Manag. Sci.* 78, 929–937. <https://doi.org/10.1002/ps.6702>
- Denoirjean, T., Géraldine, D., Cornille, A., Chen, X., Hance, T., Ameline, A., 2021. Genetic structure of *Malus sylvestris* and potential link with preference/performance by the rosy apple aphid pest *Dysaphis plantaginea*. *Sci. Rep.* 11, 5732. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85014-x>
- Deravel, J., Lemièrre, S., Coutte, F., Krier, F., Van Hese, N., Béchet, M., Sourdeau, N., Höfte, M., Leprêtre, A., Jacques, P., 2014. Mycosubtilin and surfactin are efficient, low ecotoxicity molecules for the biocontrol of lettuce downy mildew. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 6255–6264. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5663-1>
- Desmyttere, H., Deweer, C., Muchembled, J., Sahmer, K., Jacquin, J., Coutte, F., Jacques, P., 2019. Antifungal Activities of *Bacillus subtilis* Lipopeptides to Two *Venturia inaequalis* Strains Possessing Different Tebuconazole Sensitivity. *Front. Microbiol.* 10, 2327. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02327>
- Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J.-M., 2007. The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 81–106. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440>
- Desneux, N., Rafalimanana, H., Kaiser, L., 2004. Dose–response relationship in lethal and behavioural effects of different insecticides on the parasitic wasp *Aphidius ervi*. *Chemosphere* 54, 619–627. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.09.007>

- Desneux, N., Ramirez-Romero, R., Kaiser, L., 2006. Multistep bioassay to predict recolonization potential of emerging parasitoids after a pesticide treatment. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2675–2682. <https://doi.org/10.1897/05-562R.1>
- Dewhurst, S.Y., Birkett, M.A., Loza-Reyes, E., Martin, J.L., Pye, B.J., Smart, L.E., Hardie, J., Pickett, J.A., 2012. Activation of defence in sweet pepper, *Capsicum annum*, by cis-jasmone, and its impact on aphid and aphid parasitoid behaviour. *Pest Manag. Sci.* 68, 1419–1429. <https://doi.org/10.1002/ps.3326>
- Diaz-Montano, J., Reese, J.C., Louis, J., Campbell, L.R., Schapaugh, W.T., 2007. Feeding Behavior by the Soybean Aphid (Hemiptera: Aphididae) on Resistant and Susceptible Soybean Genotypes. *J. Econ. Entomol.* 100, 984–989.
- Dib, H., Simon, S., Sauphanor, B., Capowiez, Y., 2010. The role of natural enemies on the population dynamics of the rosy apple aphid, *Dysaphis plantaginea* Passerini (Hemiptera: Aphididae) in organic apple orchards in south-eastern France. *Biol. Control* 55, 97–109. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.07.005>
- Dick, S., 1997. *Forests and Insects*. Springer Science & Business Media.
- Dixon, A.F.G., 1973. *Biology of Aphids*. Edward Arnold.
- Douglas, A.E., 2006. Phloem-sap feeding by animals: problems and solutions. *J. Exp. Bot.* 57, 747–754. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj067>
- Down, R.E., Gatehouse, A.M.R., Hamilton, W.D.O., Gatehouse, J.A., 1996. Snowdrop lectin inhibits development and decreases fecundity of the Glasshouse Potato Aphid (*Aulacorthum solani*) when administered in vitro and via transgenic plants both in laboratory and glasshouse trials. *J. Insect Physiol.* 42, 1035–1045. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(96\)00065-0](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(96)00065-0)
- Dreyer, D.L., Jones, K.C., 1981. Feeding deterrence of flavonoids and related phenolics towards *Schizaphis graminum* and *Myzus persicae*: Aphid feeding deterrents in wheat. *Phytochemistry* 20, 2489–2493. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(81\)83078-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)83078-6)
- El-Meniawi, F.A., Seham, M.I., 2006. Toxic and biochemical impact of certain plant essential oils on *Bemisia tabaci* Genn. (Hom., Aleyrodidae). *J. Pest. Cont. & Environ. Sci.* 14, 81–99.
- Emden, H.F.V., Harrington, R., 2007. *Aphids as Crop Pests*. CABI.
- Emmert, E.A.B., Handelsman, J., 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiol. Lett.* 171, 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13405.x>
- Encyclop'Aphid : l'encyclopédie des pucerons - *A. fabae* [WWW Document], n.d. URL <https://www6.inrae.fr/encyclopedie-pucerons/Especes/Pucerons/Aphis/A.-fabae> (accessed 6.27.22).
- Encyclop'Aphid : l'encyclopédie des pucerons - *D. plantaginea* [WWW Document], n.d. URL <https://www6.inrae.fr/encyclopedie-pucerons/Especes/Pucerons/Dysaphis/D.-plantaginea> (accessed 6.27.22).
- Entomological classics – Aphids spit: visualising aphids feeding, the electrical penetration graph, 2018. . Dont Forget Roundabouts. URL <https://simonleather.wordpress.com/2018/05/09/entomological-classics-aphids-spit-visualising-aphids-feeding-the-electrical-penetration-graph/> (accessed 10.3.22).
- EPG Systems, n.d. Measuring principles [WWW Document]. URL <https://www.epgsystems.eu/epg-measuring> (accessed 10.3.22).
- Farmer, E.E., Ryan, C.A., 1990. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 7713–7716. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.19.7713>

- Febvay, G., Delobel, B., Rahbe, Y., 1988. Influence of the amino acid balance on the improvement of an artificial diet for a biotype of *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae). *Can. J. Zool.* 66, 2449–2453. <https://doi.org/10.1139/z88-362>
- Fenwick, G.R., Heaney, R.K., Mullin, W.J., VanEtten, C.H., 1983. Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *C R C Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 18, 123–201. <https://doi.org/10.1080/10408398209527361>
- Ferrais, L., Tougeron, K., Gardin, P., Hance, T., 2021. Assessing the optimal frequency of early parasitoid releases in an apple orchard to control *Dysaphis plantaginea*: a proof of concept study. <https://doi.org/10.1101/2021.09.20.461076>
- Forbes, A.R., 1969. The stylets of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Can. Entomol.* 101, 31–41.
- Franca, S., Breda, M., Barbosa, D., Araujo, A., Guedes, C., 2017. The Sublethal Effects of Insecticides in Insects. <https://doi.org/10.5772/66461>
- Frantík, E., Horváth, M., 1992. Integration of behavioral and neurophysiological approaches in neurotoxicology. *Toxicol. Lett.* 64–65, 225–229. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(92\)90193-N](https://doi.org/10.1016/0378-4274(92)90193-N)
- Fuentes-Contreras, E., Niemeyer, H.M., 1998. DIMBOA glucoside, a wheat chemical defense, affects host acceptance and suitability of *Sitobion avenae* to the cereal aphid parasitoid *Aphidius rhopalosiphi*. *Journal of Chemical Ecology* 24, 371–381.
- Gabrys, B., Tjallingii, W. f., 2002. The role of sinigrin in host plant recognition by aphids during initial plant penetration. *Entomol. Exp. Appl.* 104, 89–93. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2002.00994.x>
- Garzo, E., Bonani, J.P., Lopes, J.R.S., Fereres, A., 2012. Morphological description of the mouthparts of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). *Arthropod Struct. Dev.* 41, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2011.07.005>
- Garzo, E., Moreno, A., Plaza, M., Fereres, A., 2020. Feeding Behavior and Virus-Transmission Ability of Insect Vectors Exposed to Systemic Insecticides. *Plants Basel Switz.* 9, 895. <https://doi.org/10.3390/plants9070895>
- Gatehouse, A.M.R., Down, R.E., Powell, K.S., Sauvion, N., Rahbé, Y., Newell, C.A., Merryweather, A., Hamilton, W.D.O., Gatehouse, J.A., 1996. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the peach-potato aphid *Myzus persicae*. *Entomol. Exp. Appl.* 79, 295–307. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1996.tb00837.x>
- Geetha, I., Paily, K.P., Manonmani, A.M., 2012. Mosquito adulticidal activity of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis subsp. subtilis*. *Pest Manag. Sci.* 68, 1447–1450. <https://doi.org/10.1002/ps.3324>
- Ghribi, D., Elleuch, M., Abdelkefi, L., Ellouze-Chaabouni, S., 2012. Evaluation of larvicidal potency of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant against *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae and influence of abiotic factors on its insecticidal activity. *J. Stored Prod. Res.* 48, 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2011.10.002>
- Glinwood, R., Ninkovic, V., Pettersson, J., 2011. Chemical interaction between undamaged plants – Effects on herbivores and natural enemies. *Phytochemistry* 72, 1683–1689. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.02.010>
- Goławska, S., Łukasik, I., 2012. Antifeedant activity of luteolin and genistein against the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J. Pest Sci.* 85, 443–450. <https://doi.org/10.1007/s10340-012-0452-z>
- Gómez-Guzmán, J.A., García-Marín, F.J., Sáinz-Pérez, M., González-Ruiz, R., 2017. Behavioural Resistance in Insects: Its Potential Use as Bio Indicator of Organic Agriculture. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 95, 042038. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/95/4/042038>

- Görg, L.M., Gallinger, J., Gross, J., 2021. The phytopathogen ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ alters apple tree phloem composition and affects oviposition behavior of its vector *Cacopsylla picta*. *Chemoecology* 31, 31–45. <https://doi.org/10.1007/s00049-020-00326-0>
- Gray, S.M., Banerjee, N., 1999. Mechanisms of Arthropod Transmission of Plant and Animal Viruses. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 128–148.
- Gross, B.L., Henk, A.D., Forsline, P.L., Richards, C.M., Volk, G.M., 2012. Identification of interspecific hybrids among domesticated apple and its wild relatives. *Tree Genet. Genomes* 8, 1223–1235. <https://doi.org/10.1007/s11295-012-0509-4>
- Guo, D.-L., Wan, B., Xiao, S.-J., Allen, S., Gu, Y.-C., Ding, L.-S., Zhou, Y., 2015. Cyclic Lipopeptides with Herbicidal and Insecticidal Activities Produced by *Bacillus clausii* DTM1. *Nat. Prod. Commun.* 10, 1934578X1501001. <https://doi.org/10.1177/1934578X1501001235>
- Hardie, J., 1989. Spectral specificity for targeted flight in the black bean aphid, *Aphis fabae*. *J. Insect Physiol.* 35, 619–626. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(89\)90124-8](https://doi.org/10.1016/0022-1910(89)90124-8)
- Hardie, J., Isaacs, R., Pickett, J.A., Wadhams, L.J., Woodcock, C.M., 1994. Methyl salicylate and (–)-(1R,5S)-myrtenal are plant-derived repellents for black bean aphid, *Aphis fabae* Scop. (Homoptera: Aphididae). *J. Chem. Ecol.* 20, 2847–2855. <https://doi.org/10.1007/BF02098393>
- Hardie, J., Powell, G., 2000. Close-up video combined with electronic monitoring of plant penetration and behavioral effects of an aphid (Homoptera: Aphididae) antifeedant. *Princ. Appl. Electron. Monit. Tech. Study Homopteran Feed. Behav.* 201–211.
- Harrewijn, P., Kayser, H., 1997. Pymetrozine, a Fast-Acting and Selective Inhibitor of Aphid Feeding. In-situ Studies with Electronic Monitoring of Feeding Behaviour. *Pestic. Sci.* 49, 130–140. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199702\)49:2<130::AID-PS509>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199702)49:2<130::AID-PS509>3.0.CO;2-U)
- Harrewijn, P., van Oosten, A.M., Piron, P.G.M., 2002. Natural Terpenoids as Messengers. *Nat. Prod. Rep.* 19, 379–380. <https://doi.org/10.1039/b203581m>
- Harshman, J.M., Evans, K.M., Allen, H., Potts, R., Flamenco, J., Aldwinckle, H.S., Wisniewski, M.E., Norelli, J.L., 2017. Fire Blight Resistance in Wild Accessions of *Malus sieversii*. *Plant Dis.* 101, 1738–1745. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-17-0077-RE>
- Harvey, J.A., Gols, R., 2018. Effects of plant-mediated differences in host quality on the development of two related endoparasitoids with different host-utilization strategies. *J. Insect Physiol.* 107, 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.03.006>
- Haynes, K.F., 1988. Sublethal Effects of Neurotoxic Insecticides on Insect Behavior. *Annu. Rev. Entomol.* 33, 149–168. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.33.010188.001053>
- Henneberg, B., Meiners, T., Mody, K., Obermaier, E., 2022. Morphological and olfactory tree traits influence the susceptibility and suitability of the apple species *Malus domestica* and *M. sylvestris* to the florivorous weevil *Anthonomus pomorum* (Coleoptera: Curculionidae). *PeerJ* 10, e13566. <https://doi.org/10.7717/peerj.13566>
- Henry, L.M., Gillespie, D.R., Roitberg, B.D., 2005. Does mother really know best? Oviposition preference reduces reproductive performance in the generalist parasitoid *Aphidius ervi*. *Entomol. Exp. Appl.* 116, 167–174. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2005.00318.x>
- Hildebrand, D.F., Brown, G.C., Jackson, D.M., Hamilton-Kemp, T.R., 1993. Effects of some leaf-emitted volatile compounds on aphid population increase. *J. Chem. Ecol.* 19, 1875–1887. <https://doi.org/10.1007/BF00983793>
- Himanen, S.J., Blande, J.D., Klemola, T., 2010. Birch (*Betula* spp.) leaves adsorb and re-release volatiles specific to neighbouring plants – a mechanism for associational herbivore

- resistance? *New Phytol* 186, 722–732. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03220.x>
- Hirata, M., Sogawa, K., 1976. Antifeeding activity of Chlordimeform for plant-sucking insects. *Appl. Entomol. Zool.* 11, 94–99.
- Hodgkin, T., Hajjar, R., 2007. Using crop wild relatives for crop improvement: trends and perspectives., in: Maxted, N., Ford-Lloyd, B.V., Kell, S.P., Iriondo, J.M., Dulloo, M.E., Turok, J. (Eds.), *Crop Wild Relative Conservation and Use*. CABI, Wallingford, pp. 535–548.
- Hodkinson, I.D., 2009. Life cycle variation and adaptation in jumping plant lice (Insecta: Hemiptera: Psylloidea): a global synthesis. *J. Nat. Hist.* 43, 65–179. <https://doi.org/10.1080/00222930802354167>
- Hori, M., 1998. Repellency of rosemary oil against *Myzus persicae* in a laboratory and in a greenhouse 24, 1425–1432.
- Hori, M., 1996. Settling inhibition and insecticidal activity of garlic and onion oils against *Myzus persicae* (Sulzer)(Homoptera: Aphididae). *Appl. Entomol. Zool.* 31, 605–612.
- Howe, G.A., Jander, G., 2008. Plant Immunity to Insect Herbivores. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 41–66. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092825>
- Hu, H., Li, J., Delatte, T., Vervoort, J., Gao, L., Verstappen, F., Xiong, W., Gan, J., Jongsma, M.A., Wang, C., 2018. Modification of chrysanthemum odour and taste with chrysanthemol synthase induces strong dual resistance against cotton aphids. *Plant Biotechnol. J.* 16, 1434–1445. <https://doi.org/10.1111/pbi.12885>
- Huang, Y., Ho, S.H., 1998. Toxicity and antifeedant activities of cinnamaldehyde against the grain storage insects, *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *J. Stored Prod. Res.* 34, 11–17. [https://doi.org/10.1016/S0022-474X\(97\)00038-6](https://doi.org/10.1016/S0022-474X(97)00038-6)
- Hullé, M., Chaubet, B., Turpeau, E., Simon, J.-C., 2020. Encyclop'Aphid: a website on aphids and their natural enemies. *Entomol. Gen.* 40, 97–101. <https://doi.org/10.1127/entomologia/2019/0867>
- Ikeura, H., Kobayashi, F., Hayata, Y., 2012. Repellent Effect of Herb Extracts on the Population of Wingless Green Peach Aphid, *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae). *J. Agric. Sci.* 4, 139–144. <https://doi.org/10.5539/jas.v4n5p139>
- Irving, B.S.N., Wyatt, I.J., 1973. Effects of sublethal doses of pesticides on the oviposition behaviour of *Encarsia formosa*. *Ann. Appl. Biol.* 75, 57–62. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1973.tb01337.x>
- Jenczewski, E., Ronfort, J., Chèvre, A.-M., 2003. Crop-to-wild gene flow, introgression and possible fitness effects of transgenes. *Environ. Biosafety Res.* 2, 9–24. <https://doi.org/10.1051/ebr:2003001>
- Jhou, Y.-S., Poovendhan, S., Huang, L.-H., Tsai, C.-W., 2021. Host Acceptance and Plant Resistance: A Comparative Behavioral Study of *Myzus persicae* and *Acyrtosiphon pisum*. *Insects* 12, 975. <https://doi.org/10.3390/insects12110975>
- Jiang, H., Wang, J., Song, L., Cao, X., Yao, X., Tang, F., Yue, Y., 2016. GC/MS Analysis of Essential Oils Composition from Leaves, Twigs and Seeds of *Cinnamomum camphora* L. Presl and Their Insecticidal and Repellent Activities. *Molecules* 21, 423.
- Joshi, N.K., Rajotte, E.G., Myers, C.T., Krawczyk, G., Hull, L.A., 2015. Development of a Susceptibility Index of Apple Cultivars for Codling Moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) Oviposition. *Front. Plant Sci.* 6, 992.
- Kalinová, B., Stránský, K., Harmatha, J., Čtvrtečka, R., Žďárek, J., 2000. Can chemical cues from blossom buds influence cultivar preference in the apple blossom weevil (*Anthonomus pomorum*)? *Entomol. Exp. Appl.* 95, 47–52. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2000.00640.x>

- Kalule, T., Wright, D.J., 2005. Effect of cultivars with varying levels of resistance to aphids on development time, sex ratio, size and longevity of the parasitoid *Aphidius colemani*. *BioControl* 50, 235–246. <https://doi.org/10.1007/s10526-004-3072-6>
- Kaplan, I., Carrillo, J., Garvey, M., Ode, P.J., 2016. Indirect plant–parasitoid interactions mediated by changes in herbivore physiology. *Curr. Opin. Insect Sci.* 14, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2016.03.004>
- Karban, R., Baldwin, I.T., Baxter, K.J., Laue, G., Felton, G.W., 2000. Communication between plants: induced resistance in wild tobacco plants following clipping of neighboring sagebrush. *Oecologia* 125, 66–71. <https://doi.org/10.1007/PL00008892>
- Karban, R., Yang, L.H., Edwards, K.F., 2014. Volatile communication between plants that affects herbivory: a meta-analysis. *Ecol Lett* 17, 44–52. <https://doi.org/10.1111/ele.12205>
- Karlsson Green, K., Stenberg, J.A., Lankinen, Å., 2020. Making sense of Integrated Pest Management (IPM) in the light of evolution. *Evol. Appl.* 13, 1791–1805. <https://doi.org/10.1111/eva.13067>
- Kehr, J., 2006. Phloem sap proteins: their identities and potential roles in the interaction between plants and phloem-feeding insects. *J. Exp. Bot.* 57, 767–774. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj087>
- Kellow, A.V., Sedgley, M., van Heeswijck, R., 2004. Interaction Between *Vitis vinifera* and Grape *Phylloxera*: Changes in Root Tissue During Nodosity Formation. *Ann. Bot.* 93, 581–590. <https://doi.org/10.1093/aob/mch082>
- Khan, Z.R., Saxena, R.C., 1986. Technique for Locating Planthopper (Homoptera: Delphacidae) and Leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) Eggs in Rice Plants. *J. Econ. Entomol.* 79, 271–273. <https://doi.org/10.1093/jee/79.1.271>
- Khorrami, F., Valizadegan, O., Forouzan, M., Soleymanzade, A., 2018. The antagonistic/synergistic effects of some medicinal plant essential oils, extracts and powders combined with Diatomaceous earth on red flour beetle, *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 51, 685–695. <https://doi.org/10.1080/03235408.2018.1458412>
- Kim, S.-I., Roh, J.-Y., Kim, D.-H., Lee, H.-S., Ahn, Y.-J., 2003. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. *J. Stored Prod. Res.* 39, 293–303. [https://doi.org/10.1016/S0022-474X\(02\)00017-6](https://doi.org/10.1016/S0022-474X(02)00017-6)
- Kingston, K.B., Powell, K.S., Cooper, P.D., 2007. Characterizing the root-feeding habits of grape *Phylloxera* using electrical penetration graph. *Acta Horticultura* 733, 33–45.
- Klingauf, F.A., 1987. Feeding, adaptation and excretion. *Aphids Their Biol. Nat. Enemies Control* Ed. AK Minks P Harrewijn.
- Klingler, J., Powell, G., Thompson, G.A., Isaacs, R., 1998. Phloem specific aphid resistance in *Cucumis melo* line AR 5: effects on feeding behaviour and performance of *Aphis gossypii*. *Entomol. Exp. Appl.* 86, 79–88. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1998.00267.x>
- Klocke, J.A., Kubo, I., 1991. Defense of Plants through Regulation of Insect Feeding Behavior. *Fla. Entomol.* 74, 18–23. <https://doi.org/10.2307/3495236>
- Knuff, A.K., Obermaier, E., Mody, K., 2017. Differential susceptibility and suitability of domestic and wild apple species for a florivorous weevil and its parasitoids. *J. Appl. Entomol.* 141, 285–299. <https://doi.org/10.1111/jen.12341>
- Ko, A.-Y., Abd El-Aty, A.M., Rahman, Md.M., Jang, J., Kim, S.-W., Choi, J.-H., Shim, J.-H., 2014. A modified QuEChERS method for simultaneous determination of flonicamid and its metabolites in paprika using tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 157, 413–420. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.038>

- Kobayashi, M., Ishikawa, H., 1993. Breakdown of indirect flight muscles of alate aphids (*Acyrtosiphon pisum*) in relation to their flight, feeding and reproductive behavior. *J. Insect Physiol.* 39, 549–554. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(93\)90036-Q](https://doi.org/10.1016/0022-1910(93)90036-Q)
- Koo, H.-N., Lee, S.-W., Yun, S.-H., Kim, H.K., Kim, G.-H., 2015. Feeding response of the cotton aphid, *Aphis gossypii*, to sublethal rates of flonicamid and imidacloprid. *Entomol. Exp. Appl.* 154, 110–119. <https://doi.org/10.1111/eea.12260>
- Kramer, K., Leinonen, I., Loustau, D., 2000. The importance of phenology for the evaluation of impact of climate change on growth of boreal, temperate and Mediterranean forests ecosystems: an overview. *Int. J. Biometeorol.* 44, 67–75. <https://doi.org/10.1007/s004840000066>
- Kumar, S., Singh, A., 2015. Biopesticides: Present Status and the Future Prospects. *J. Fertil. Pestic.* 6, 1000e129. <https://doi.org/10.4172/2471-2728.1000e129>
- Kumrungeesee, N., Pluempanupat, W., Koul, O., Bullangpoti, V., 2014. Toxicity of essential oil compounds against diamondback moth, *Plutella xylostella*, and their impact on detoxification enzyme activities. *J. Pest Sci.* 87, 721–729. <https://doi.org/10.1007/s10340-014-0602-6>
- Lapointe, S.L., Tingey, W.M., 1984. Feeding Response of the Green Peach Aphid (Homoptera: Aphididae) to Potato Glandular Trichomes. *J. Econ. Entomol.* 77, 386–389. <https://doi.org/10.1093/jee/77.2.386>
- Lattanzio, V., Arpaia, S., Cardinali, A., Di Venere, D., Linsalata, V., 2000. Role of Endogenous Flavonoids in Resistance Mechanism of *Vigna* to Aphids. *J. Agric. Food Chem.* 48, 5316–5320. <https://doi.org/10.1021/jf000229y>
- Laurens, F., Lespinasse, Y., Fouillet, A., 2005. A New Scab-resistant Apple: 'Ariane'. *HortScience* 40, 484–485. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.40.2.484>
- Le Lann, C., Visser, B., van Baaren, J., van Alphen, J.J.M., Ellers, J., 2012. Comparing resource exploitation and allocation of two closely related aphid parasitoids sharing the same host. *Evol. Ecol.* 26, 79–94. <https://doi.org/10.1007/s10682-011-9498-2>
- Le Roux, V., Dugravot, S.B., Campan, E., Dubois, F.O., Vincent, C., Giordanengo, P., 2008. Wild *Solanum* Resistance to Aphids: Antixenosis or Antibiosis? *J. Econ. Entomol.* 101, 584–591.
- Le Roux, V., Saguez, J., Vincent, C., Giordanengo, P., 2004. Rapid Method to Screen Resistance of Potato Plants Against *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) in the Laboratory. *J. Econ. Entomol.* 97, 2079–2082.
- Leclant, F., 1981. Les effets nuisibles des pucerons sur les cultures, in: *Les Pucerons Des Cultures*. pp. 37–56.
- Leconte, A., Tournant, L., Muchembled, J., Paucellier, J., Héquet, A., Deracinois, B., Deweer, C., Krier, F., Deleu, M., Oste, S., Jacques, P., Coutte, F., 2022. Assessment of Lipopeptide Mixtures Produced by *Bacillus subtilis* as Biocontrol Products against Apple Scab (*Venturia inaequalis*). *Microorganisms* 10, 1810. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091810>
- Lee Chao, S., Dennehy, T.J., Casida, J.E., 1997. Whitefly (Hemiptera: Aleyrodidae) Binding Site for Imidacloprid and Related Insecticides: A Putative Nicotinic Acetylcholine Receptor. *J. Econ. Entomol.* 90, 879–882. <https://doi.org/10.1093/jee/90.4.879>
- Lee, E.-J., Kim, J.-R., Choi, D.-R., Ahn, Y.-J., 2008. Toxicity of Cassia and Cinnamon Oil Compounds and Cinnamaldehyde-Related Compounds to *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.* 101, 1960–1966. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-101.6.1960>
- Leopold, R.A., Freeman, T.P., Buckner, J.S., Nelson, D.R., 2003. Mouthpart morphology and stylet penetration of host plants by the glassy-winged sharpshooter, *Homalodisca*

- coagulata*, (Homoptera: Cicadellidae). *Arthropod Struct. Dev.* 32, 189–199. [https://doi.org/10.1016/S1467-8039\(03\)00047-1](https://doi.org/10.1016/S1467-8039(03)00047-1)
- Leybourne, D., Aradottir, G., 2021. Common resistance mechanisms are deployed by plants against sap-feeding herbivorous insects: insights from a meta-analysis and systematic review (preprint). *Zoology*. <https://doi.org/10.1101/2021.11.05.467399>
- Liaudanskas, M., Viškelis, P., Raudonis, R., Kviklys, D., Uselis, N., Janulis, V., 2014. Phenolic Composition and Antioxidant Activity of *Malus domestica* Leaves. *Sci. World J.* 2014, 306217. <https://doi.org/10.1155/2014/306217>
- Liu, X.D., Zhai, B.P., Zhang, X.X., Zong, J.M., 2005. Impact of transgenic cotton plants on a non-target pest, *Aphis gossypii* Glover. *Ecol. Entomol.* 30, 307–315. <https://doi.org/10.1111/j.0307-6946.2005.00690.x>
- Lombarkia, N., Derridj, S., 2008. Resistance of apple trees to *Cydia pomonella* egg-laying due to leaf surface metabolites. *Entomol. Exp. Appl.* 128, 57–65. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2008.00741.x>
- Long, T.F., Murdock, L.L., 1983. Stimulation of blowfly feeding behavior by octopaminergic drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 4159–4163. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.13.4159>
- Lu, B.-R., 2013. Introgression of transgenic crop alleles: Its evolutionary impacts on conserving genetic diversity of crop wild relatives. *J. Syst. Evol.* 51, 245–262. <https://doi.org/10.1111/jse.12011>
- Lu, H., Yang, P., Xu, Y., Luo, L., Zhu, J., Cui, N., Kang, L., Cui, F., 2016. Performances of survival, feeding behavior and gene expression in aphids reveal their different fitness to host alteration. *Sci. Rep.* 6, 19344. <https://doi.org/10.1038/srep19344>
- Lucini, T., Panizzi, A.R., 2018. Electropenetrography (EPG): a Breakthrough Tool Unveiling Stink Bug (Pentatomidae) Feeding on Plants. *Neotrop. Entomol.* 47, 6–18. <https://doi.org/10.1007/s13744-017-0574-3>
- Lucini, T., Panizzi, A.R., 2017. Probing Behavior of *Dichelops furcatus* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) on Wheat Plants Characterized by Electropenetrography (EPG) and Histological Studies. *J. Insect Sci.* 17, 65. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iex044>
- MacKay, P.A., Downer, R.G.H., 1979. Water content, weight change, and activity of apterous and alate virginoparous *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Homoptera: Aphididae). *Can. J. Zool.* 57, 363–367. <https://doi.org/10.1139/z79-042>
- Maget-Dana, R., Thimon, L., Peypoux, F., Ptak, M., 1992. Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie* 74, 1047–1051. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(92\)90002-V](https://doi.org/10.1016/0300-9084(92)90002-V)
- Mann, R.S., Rouseff, R.L., Smoot, J.M., Castle, W.S., Stelinski, L.L., 2011. Sulfur volatiles from *Allium* spp. affect Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), response to citrus volatiles. *Bull. Entomol. Res.* 101, 89–97. <https://doi.org/10.1017/S0007485310000222>
- Mantzoukas, S., Kalyvas, N., Ntoukas, A., Lagogiannis, I., Farsalinos, K., Eliopoulos, P.A., Poulas, K., 2020. Combined Toxicity of Cannabidiol Oil with Three Bio-Pesticides against Adults of *Sitophilus Zeamais*, *Rhyzopertha Dominica*, *Prostephanus Truncatus* and *Trogoderma Granarium*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17, 6664. <https://doi.org/10.3390/ijerph17186664>
- Marchetti, E., Civolani, S., Leis, M., Chicca, M., Tjallingii, W.F., Pasqualini, E., Baronio, P., 2009. Tissue location of resistance in apple to the rosy apple aphid established by electrical penetration graphs. *Bull. Insectology* 62, 203–208.
- Mardani, A., Sabahi, Q., Rasekh, A., Almasi, A., 2016. Lethal and sublethal effects of three insecticides on the aphid parasitoid, *Lysiphlebus fabarum* Marshall (Hymenoptera: Aphidiidae). *Phytoparasitica* 44, 91–98. <https://doi.org/10.1007/s12600-015-0502-1>

- Martín, B., Collar, J.L., Tjallingii, W.F., Fereres, A., 1997. Intracellular ingestion and salivation by aphids may cause the acquisition and inoculation of non-persistently transmitted plant viruses. *J. Gen. Virol.* 78, 2701–2705. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-10-2701>
- McLean, D.L., Kinsey, M.G., 1967. Probing Behavior of the Pea Aphid, *Acyrtosiphon pisum*. I. Definitive Correlation of Electronically Recorded Waveforms with Aphid Probing Activities. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 60, 400–405. <https://doi.org/10.1093/aesa/60.2.400>
- McLean, D.L., Kinsey, M.G., 1964. A Technique for Electronically Recording Aphid Feeding and Salivation. *Nature* 202, 1358–1359. <https://doi.org/10.1038/2021358a0>
- Meade, T., Hare, D.J., 1995. Integration of Host Plant Resistance and *Bacillus thuringiensis* Insecticides in the Management of Lepidopterous Pests of Celery. *J. Econ. Entomol.* 88, 1787–1794. <https://doi.org/10.1093/jee/88.6.1787>
- Miao, J., Du, Z.-B., Wu, Y.-Q., Gong, Z.-J., Jiang, Y.-L., Duan, Y., Li, T., Lei, C.-L., 2014. Sub-lethal effects of four neonicotinoid seed treatments on the demography and feeding behaviour of the wheat aphid *Sitobion avenae*. *Pest Manag. Sci.* 70, 55–59. <https://doi.org/10.1002/ps.3523>
- Miles, P.W., 1999. Aphid saliva. *Biol. Rev.* 74, 41–85. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1999.tb00181.x>
- Miles, P.W., 1972. The Saliva of Hemiptera, in: Treherne, J.E., Berridge, M.J., Wigglesworth, V.B. (Eds.), *Advances in Insect Physiology*. Academic Press, pp. 183–255. [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(08\)60277-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(08)60277-5)
- Miñarro, M., Dapena, E., 2008. Tolerance of some scab-resistant apple cultivars to the rosy apple aphid, *Dysaphis plantaginea*. *Crop Prot.* 27, 391–395. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2007.07.003>
- Miñarro, M., Dapena, E., 2007. Resistance of Apple Cultivars to *Dysaphis plantaginea* (Hemiptera: Aphididae): Role of Tree Phenology in Infestation Avoidance. *Environ. Entomol.* 36, 1206–11. [https://doi.org/10.1603/0046-225X\(2007\)36\[1206:ROACTD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0046-225X(2007)36[1206:ROACTD]2.0.CO;2)
- Minks, A.K., Harrewijn, P., 1987. *Aphids: Their Biology, Natural Enemies*. Amsterdam: Elsevier.
- Mittler, T.E., 1967. Effect of Amino Acid and Sugar Concentrations on the Food Uptake of the Aphid *Myzus Persicae*. *Entomol. Exp. Appl.* 10, 39–51. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1967.tb00043.x>
- Mittler, T.E., 1957. Studies on the feeding and nutrition of *Tuberolachnus salignus* (Gmelin) (Homoptera, Aphididae). I. The uptake of phloem sap. *J. Exp. Biol.* 34, 334–341.
- Mittler, T.E., Dadd, R.H., 1964. Gustatory Discrimination Between Liquids by the Aphid *Myzus Persicae* (sulzer). *Entomol. Exp. Appl.* 7, 315–328. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1964.tb00733.x>
- Mobki, M., Safavi, S.A., Safaralizadeh, M.H., Panahi, O., 2014. Toxicity and repellency of garlic (*Allium sativum* L.) extract grown in Iran against *Tribolium castaneum* (Herbst) larvae and adults. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 47, 59–68. <https://doi.org/10.1080/03235408.2013.802896>
- Mody, K., Collatz, J., Dorn, S., 2015. Plant genotype and the preference and performance of herbivores: cultivar affects apple resistance to the florivorous weevil *Anthonomus pomorum*. *Agric. For. Entomol.* 17, 337–346. <https://doi.org/10.1111/afe.12112>
- Mody, K., Spoerndli, C., Dorn, S., 2011. Within-orchard variability of the ecosystem service ‘parasitism’: Effects of cultivars, ants and tree location. *Basic Appl. Ecol.* 12, 456–465. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2011.05.005>

- Montgomery, M.E., Arn, H., 1974. Feeding response of *Aphis pomi*, *Myzus persicae*, and *Amphorophora agathonica* to phlorizin. *J. Insect Physiol.* 20, 413–421. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(74\)90071-7](https://doi.org/10.1016/0022-1910(74)90071-7)
- Mora, I., Cabrefiga, J., Montesinos, E., 2015. Cyclic Lipopeptide Biosynthetic Genes and Products, and Inhibitory Activity of Plant-Associated *Bacillus* against Phytopathogenic Bacteria. *PLOS ONE* 10, e0127738. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127738>
- Moreira, X., Abdala-Roberts, L., Gols, R., Francisco, M., 2018. Plant domestication decreases both constitutive and induced chemical defences by direct selection against defensive traits. *Sci. Rep.* 8, 12678. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31041-0>
- Moreno-Delafuente, A., Garzo, E., Fereres, A., Viñuela, E., Medina, P., 2020. Effects of a Salicylic Acid Analog on *Aphis gossypii* and Its Predator *Chrysoperla carnea* on Melon Plants. *Agronomy* 10, 1830. <https://doi.org/10.3390/agronomy10111830>
- Morita, M., Ueda, T., Yoneda, T., Koyanagi, T., Haga, T., 2007. Flonicamid, a novel insecticide with a rapid inhibitory effect on aphid feeding. *Pest Manag. Sci.* 63, 969–973. <https://doi.org/10.1002/ps.1423>
- Mossa, A.-T.H., 2016. Green Pesticides: Essential Oils as Biopesticides in Insect-pest Management. *J. Environ. Sci. Technol.* 9, 354–378. <https://doi.org/10.3923/jest.2016.354.378>
- Nachappa, P., Culkin, C.T., Saya, P.M., Han, J., Nalam, V.J., 2016. Water Stress Modulates Soybean Aphid Performance, Feeding Behavior, and Virus Transmission in Soybean. *Front. Plant Sci.* 7, 552.
- Nault, L.R., Styer, W.E., 1972. Effects of Sinigrin on Host Selection by Aphids. *Entomol. Exp. Appl.* 15, 423–437. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1972.tb00230.x>
- Neal, J.J., Tingey, W.M., Steffens, J.C., 1990. Sucrose esters of carboxylic acids in glandular trichomes of *Solanum berthaultii* deter settling and probing by green peach aphid. *J. Chem. Ecol.* 16, 487–497. <https://doi.org/10.1007/BF01021780>
- Nerio, L.S., Olivero-Verbel, J., Stashenko, E., 2010. Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresour. Technol.* 101, 372–378. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.048>
- Ni, X., Quisenberry, S.S., 1997. Distribution of Russian Wheat Aphid (Homoptera: Aphididae) Salivary Sheaths in Resistant and Susceptible Wheat Leaves. *J. Econ. Entomol.* 90, 848–853. <https://doi.org/10.1093/jee/90.3.848>
- Niemeyer, H.M., 1990. Secondary plant chemicals in aphidehost interactions, in: *Aphide Plant Interactions: Populations to Molecules*. Stillwater, OK: USDA/Agricultural Research Service, Oklahoma State University, pp. 101–111.
- Ninkovic, V., Rensing, M., Dahlin, I., Markovic, D., 2019. Who is my neighbor? Volatile cues in plant interactions. *Plant Signal Behav* 14, 1634993. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1634993>
- Nisbet, A.J., Woodford, J. a. T., Strang, R.H.C., 1994. Quantifying aphid feeding on non-radioactive food sources. *Entomol. Exp. Appl.* 72, 85–89. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1994.tb01805.x>
- Nottingham, S.F., Hardie, J., 1993. Flight behaviour of the black bean aphid, *Aphis fabae*, and the cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae*, in host and non-host plant odour. *Physiol. Entomol.* 18, 389–394. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1993.tb00612.x>
- Nottingham, S.F., Hardie, J., Dawson, G.W., Hick, A.J., Pickett, J.A., Wadhams, L.J., Woodcock, C.M., 1991. Behavioral and electrophysiological responses of Aphids to host and nonhost plant volatiles. *J. Chem. Ecol.* 17, 1231–1242. <https://doi.org/10.1007/BF01402946>

- Nowak, H., Komor, E., 2010. How aphids decide what is good for them: experiments to test aphid feeding behaviour on *Tanacetum vulgare* (L.) using different nitrogen regimes. *Oecologia* 163, 973–984. <https://doi.org/10.1007/s00442-010-1652-y>
- O'Brien, P.J., Elzen, G.W., Vinson, S.B., 1985. Toxicity of Azinphosmethyl and Chlordimeform to Parasitoid *Bracon mellitor* (Hymenoptera: Braconidae): Lethal and Reproductive Effects. *Environ. Entomol.* 14, 891–894. <https://doi.org/10.1093/ee/14.6.891>
- Olvera-Vazquez, S.G., Remoué, C., Venon, A., Rousselet, A., Grandcolas, O., Azrine, M., Momont, L., Galan, M., Benoit, L., David, G.M., Alhmedi, A., Beliën, T., Alins, G., Franck, P., Haddioui, A., Jacobsen, S.K., Andreev, R., Simon, S., Sigsgaard, L., Guibert, E., Tournant, L., Gazel, F., Mody, K., Khachtib, Y., Roman, A., Ursu, T.M., Zakharov, I.A., Belcram, H., Harry, M., Roth, M., Simon, J.C., Oram, S., Ricard, J.M., Agnello, A., Beers, E.H., Engelman, J., Balti, I., Salhi-Hannachi, A., Zhang, H., Tu, H., Mottet, C., Barrès, B., Degrave, A., Razmjou, J., Giraud, T., Falque, M., Dapena, E., Miñarro, M., Jardillier, L., Deschamps, P., Jousselin, E., Cornille, A., 2021. Large-scale geography survey provides insights into the colonization history of a major aphid pest on its cultivated apple host in Europe, North America and North Africa. *Peer Community J.* 1, e34. <https://doi.org/10.24072/pcjournal.26>
- Ongena, M., Jacques, P., 2008. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16, 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.-L., Thonart, P., 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol.* 9, 1084–1090. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>
- Oulebsir-Mohandkaci, H., Kaki, S.A., 2015. Essential Oils of two Algerian aromatic plants *Thymus vulgaris* and *Eucalyptus globulus* as Bio-insecticides against aphid *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) 22, 185–197.
- Pallippambil, G.R., Reese, J.C., Avila, C.A., Louis, J.M., Goggin, F.L., 2010. Mi-mediated aphid resistance in tomato: tissue localization and impact on the feeding behavior of two potato aphid clones with differing levels of virulence. *Entomol. Exp. Appl.* 135, 295–307. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2010.00995.x>
- Panda, N., Khush, G.S., 1995. Host plant resistance to insects. CAB INTERNATIONAL.
- Parent, G.J., Giguère, I., Germanos, G., Lamara, M., Bauce, É., MacKay, J.J., 2017. Insect herbivory (*Choristoneura fumiferana*, Tortricidea) underlies tree population structure (*Picea glauca*, Pinaceae). *Sci. Rep.* 7, 42273. <https://doi.org/10.1038/srep42273>
- Pelletier, Y., 1990. The role of the color of the substratum on the initiation of the probing behavior in *Myzus persicae* (Sulzer) and *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Homoptera: Aphididae). *Can. J. Zool.* 68, 694–698. <https://doi.org/10.1139/z90-101>
- Peters, W.S., van Bel, A.J.E., Knoblauch, M., 2006. The geometry of the forisome–sieve element–sieve plate complex in the phloem of *Vicia faba* L. leaflets. *J. Exp. Bot.* 57, 3091–3098. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl072>
- Peterson, J., Dwyer, J., 1998. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutr. Res.* 18, 1995–2018. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(98\)00169-9](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(98)00169-9)
- Pfister, W.R., Hollingworth, R.M., Yim, G.K.W., 1978. Increased feeding in rats treated with chlordimeform and related formamidines: A new class of appetite stimulants. *Psychopharmacology (Berl.)* 60, 47–51. <https://doi.org/10.1007/BF00429178>
- Pickett, J.A., Wadhams, L.J., 1992. The Chemical Ecology of Aphids. *Annu Rev Entomol* 37, 67–90.
- Pires, T.C.S.P., Dias, M.I., Barros, L., Alves, M.J., Oliveira, M.B.P.P., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R., 2018. Antioxidant and antimicrobial properties of dried Portuguese

- apple variety (*Malus domestica* Borkh. cv Bravo de Esmolfe). Food Chem. 240, 701–706. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.010>
- Piskorski, R., Dorn, S., 2010. Early-Season Headspace Volatiles from Apple and Their Effect on the Apple Blossom Weevil *Anthonomus pomorum*. Chem. Biodivers. 7, 2254–2260. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201000221>
- Plata-Rueda, A., Martínez, L.C., Santos, M.H.D., 2017. Insecticidal activity of garlic essential oil and their constituents against the mealworm beetle, *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae). Sci Rep 7, 46406. <https://doi.org/10.1038/srep46406>
- Pointeau, S., Ameline, A., Laurans, F., Sallé, A., Rahbé, Y., Bankhead-Dronnet, S., Lieutier, F., 2012. Exceptional plant penetration and feeding upon cortical parenchyma cells by the woolly poplar aphid. J. Insect Physiol. 58, 857–866. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.03.008>
- Pompon, J., Quiring, D., Goyer, C., Giordanengo, P., Pelletier, Y., 2011. A phloem-sap feeder mixes phloem and xylem sap to regulate osmotic potential. J. Insect Physiol. 57, 1317–1322. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.06.007>
- Powell, G., Hardie, J., 2001. A potent, morph-specific parturition stimulant in the overwintering host plant of the black bean aphid, *Aphis fabae*: Parturition by aphids. Physiol. Entomol. 26, 194–201. <https://doi.org/10.1046/j.0307-6962.2001.00234.x>
- Powell, G., Maniar, S.P., Pickett, J.A., Hardie, J., 1999. Aphid responses to non-host epicuticular lipids. Entomol. Exp. Appl. 91, 115–123. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1999.00473.x>
- Powell, G., Tosh, C.R., Hardie, J., 2006. Host plant selection by aphids: Behavioral, Evolutionary, and Applied Perspectives. Annu. Rev. Entomol. 51, 309–330. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151107>
- Powell, G., Tosh, C.R., Hardie, J., 2004. Parturition by colonising aphids: no correlation with phloem ingestion. Aphids New Millenn. Proc. Sixth Int. Symp. Aphids Sept. 2001 Rennes Fr. 485–489.
- Prado, E., Fred Tjallingii, W., 2007. Behavioral Evidence for Local Reduction of Aphid-Induced Resistance. J. Insect Sci. 7, 1–8. <https://doi.org/10.1673/031.007.4801>
- Prado, E., Tjallingii, W.F., 1994. Aphid activities during sieve element punctures. Entomol. Exp. Appl. 72, 157–165. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1994.tb01813.x>
- Press, M.C., Whittaker, J.B., 1993. Exploitation of the xylem stream by parasitic organisms. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 341, 101–111.
- Quarta, R., Puggioni, D., 1985. Survey on the variety susceptibility to pear psylla. Acta Hort. 159, 77–86. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1985.159.10>
- Qubbaj, T., Reineke, A., Zebitz, C.P.W., 2005. Molecular interactions between rosy apple aphids, *Dysaphis plantaginea*, and resistant and susceptible cultivars of its primary host *Malus domestica*. Entomol. Exp. Appl. 115, 145–152. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2005.00255.x>
- Raven, J.A., 1983. Phytophages of Xylem and Phloem: a Comparison of Animal and Plant Sap-feeders, in: MacFadyen, A., Ford, E.D. (Eds.), Advances in Ecological Research. Academic Press, pp. 135–234. [https://doi.org/10.1016/S0065-2504\(08\)60109-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2504(08)60109-9)
- Razmjou, J., Changizi, M., Golizadeh, A., Khiavi, H., Mottaghinia, L., 2014. Evaluation of Resistance in seven Apple Cultivars to Rosy Apple Aphid under Greenhouse and Field conditions. J. Crop Prot. 3, 173–180.
- Rechner, O., Neugart, S., Schreiner, M., Wu, S., Poehling, H.-M., 2016. Different Narrow-Band Light Ranges Alter Plant Secondary Metabolism and Plant Defense Response to Aphids. J. Chem. Ecol. 42, 989–1003. <https://doi.org/10.1007/s10886-016-0755-2>

- Reed, D.K., Kindler, S.D., Springer, T.L., 1992. Interactions of Russian wheat aphid, a hymenopterous parasitoid and resistant and susceptible slender wheatgrasses. *Entomol. Exp. Appl.* 64, 239–246. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1992.tb01614.x>
- Rehman, A., Powell, W., 2010. Host selection behaviour of aphid parasitoids (Aphidiidae: Hymenoptera). *J. Plant Breed. Crop Sci.* 2, 299–311.
- Reissig, W.H., Stanley, B.H., Hebding, H.E., 1986. Azinphosmethyl Resistance and Weight-related Response of Obliquebanded Leafroller (Lepidoptera: Tortricidae) Larvae to Insecticides. *J. Econ. Entomol.* 79, 329–333. <https://doi.org/10.1093/jee/79.2.329>
- Renwick, J.A.A., 1989. Chemical ecology of oviposition in phytophagous insects. *Experientia* 45, 223–228. <https://doi.org/10.1007/BF01951807>
- Richards, C.M., Volk, G.M., Reilley, A.A., Henk, A.D., Lockwood, D.R., Reeves, P.A., Forsline, P.L., 2009. Genetic diversity and population structure in *Malus sieversii*, a wild progenitor species of domesticated apple. *Tree Genet. Genomes* 5, 339–347.
- Richardson, A.T., Cho, J., McGhie, T.K., Larsen, D.S., Schaffer, R.J., Espley, R.V., Perry, N.B., 2020. Discovery of a stable vitamin C glycoside in crab apples (*Malus sylvestris*). *Phytochemistry* 173, 112297. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112297>
- Robertson, J.L., 1982. Effect of body weight on lethal effectiveness of a juvenile hormone analogue applied to male and female western spruce budworm (*Choristoneura occidentalis*) (Lepidoptera: Tortricidae). *Can. Entomol.* 114, 1063–1068. <https://doi.org/10.4039/Ent1141063-11>
- Robertson, J.L., Savin, N.E., Russell, R.M., 1981. Weight as a Variable in the Response of the Western Spruce Budworm to Insecticides. *J. Econ. Entomol.* 74, 643–650. <https://doi.org/10.1093/jee/74.5.643>
- Rodríguez, M., Marín, A., Torres, M., 2018. Aphicidal Activity of Surfactants Produced by *Bacillus atrophaeus* L193. *Front Microbiol* 9, 3114. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03114>
- Rodríguez, M., Marín, A., Torres, M., Béjar, V., Campos, M., Sampedro, I., 2018. Aphicidal Activity of Surfactants Produced by *Bacillus atrophaeus* L193. *Front. Microbiol.* 9, 3114. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03114>
- Rosen, D., 1990. Armored scale insects: Their biology, natural enemies, and control., Amsterdam: Elsevier. ed.
- Rummukainen, A., Julkunen-Tiitto, R., Räisänen, M., Lehto, T., 2007. Phenolic compounds in Norway spruce as affected by boron nutrition at the end of the growing season. *Plant Soil* 292, 13–23. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9167-3>
- Sabahi, Q., Rasekh, A., Michaud, J.P., 2011. Toxicity of three insecticides to *Lysiphlebus fabarum*, a parasitoid of the black bean aphid, *Aphis fabae*. *J. Insect Sci.* 11, 104. <https://doi.org/10.1673/031.011.10401>
- Sadeghi, A., Van Damme, E.J.M., Smagghe, G., 2009. Evaluation of the susceptibility of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, to a selection of novel biorational insecticides using an artificial diet. *J. Insect Sci.* 9, 1–8. <https://doi.org/10.1673/031.009.6501>
- Salsabillah, V., Putra, N.S., Aldawood, A.S., Soffan, A., 2021. Increased probing activities of green peach aphid (GPA), *Myzus persicae*, on chitosan-treated caisim (*Brassica juncea*) monitored by electrical penetration graph (EPG). *Int. J. Trop. Insect Sci.* 41, 2805–2810. <https://doi.org/10.1007/s42690-021-00461-3>
- Samara, R., Lowery, T.D., Stobbs, L.W., Vickers, P.M., Bittner, L.A., 2021. Assessment of the effects of novel insecticides on green peach aphid (*Myzus persicae*) feeding and transmission of Turnip mosaic virus (TuMV). *Pest Manag. Sci.* 77, 1482–1491. <https://doi.org/10.1002/ps.6169>

- Saravanan, P., Ramya, V., Sridhar, H., Balamurugan, V., Umamaheswari, S., 2010. Antibacterial Activity of *Allium sativum* L. on Pathogenic Bacterial Strains. *Global Veterinaria* 4, 519–522.
- Sauvion, N., 1995. Effets et modes d'action des deux lectines à mannose sur le puceron du pois, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) - Potentiel d'utilisation des lectines végétales pour la création de plantes transgéniques résistantes aux pucerons. Thèse de doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon
- Sauvion, N., Charles, H., Febvay, G., Rahbé, Y., 2004. Effects of jackbean lectin (ConA) on the feeding behaviour and kinetics of intoxication of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Entomol. Exp. Appl.* 110, 31–44. <https://doi.org/10.1111/j.0013-8703.2004.00117.x>
- Savin, N.E., Robertson, J.L., Russell, R.M., 1982. Effect of Body Weight on Lethal Dose Estimates for the Western Spruce Budworm. *J. Econ. Entomol.* 75, 538–541. <https://doi.org/10.1093/jee/75.3.538>
- Schoonhoven, L.M., Jermy, T., Loon, J.J.A. van, 1998. *Insect-plant biology: from physiology to evolution*. Chapman and Hall.
- Serikawa, R.H., Backus, E.A., Rogers, M.E., 2012. Effects of Soil-Applied Imidacloprid on Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Psyllidae) Feeding Behavior. *J. Econ. Entomol.* 105, 1492–1502. <https://doi.org/10.1603/EC11211>
- Singer, M.C., Vasco, D., Parmesan, C., Thomas, C.D., Ng, D., 1992. Distinguishing between 'preference' and 'motivation' in food choice: an example from insect oviposition. *Anim. Behav.* 44, 463–471. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(92\)90056-F](https://doi.org/10.1016/0003-3472(92)90056-F)
- Slesak, E., Slesak, M., Gabrys, B., 2001. Effect of methyl jasmonate on hydroxamic acid content, protease activity, and bird cherry–oat aphid *Rhopalosiphum padi* (L.) probing behavior. *J. Chem. Ecol.* 27, 2529–2543.
- Souissi, R., Rü, B.L., 1998. Influence of the host plant of the cassava mealybug *Phenacoccus manihoti* (Hemiptera: Pseudococcidae) on biological characteristics of its parasitoid *Apoanagyrus lopezi* (Hymenoptera: Encyrtidae). *Bull. Entomol. Res.* 88, 75–82. <https://doi.org/10.1017/S0007485300041572>
- Spiller, N. j., Koenders, L., Tjallingii, W. f., 1990. Xylem ingestion by aphids – a strategy for maintaining water balance. *Entomol. Exp. Appl.* 55, 101–104. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1990.tb01352.x>
- Stapel, J.O., Cortesero, A.M., Lewis, W.J., 2000. Disruptive Sublethal Effects of Insecticides on Biological Control: Altered Foraging Ability and Life Span of a Parasitoid after Feeding on Extrafloral Nectar of Cotton Treated with Systemic Insecticides. *Biol. Control* 17, 243–249. <https://doi.org/10.1006/bcon.1999.0795>
- Stein, T., 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.* 56, 845–857. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>
- Stöckli, S.C., 2008. Host-plant resistance in apple (*Malus x domestica* Borkh.) to common herbivore pests. Thèse de doctorat. ETH Zurich. <https://doi.org/10.3929/ETHZ-A-005711196>
- Stoeckli, S., Mody, K., Gessler, C., Christen, D., Dorn, S., 2009. Quantitative trait locus mapping of resistance in apple to *Cydia pomonella* and *Lyonetia clerkella* and of two selected fruit traits. *Ann. Appl. Biol.* 154, 377–387. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2008.00307.x>
- Storer, J.R., Powell, G., Hardie, J., 1996. Settling responses of aphids in air permeated with non-host plant volatiles. *Entomol. Exp. Appl.* 80, 76–78. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1996.tb00889.x>

- Sun, M., Voorrips, R.E., Steenhuis-Broers, G., van't Westende, W., Vosman, B., 2018. Reduced phloem uptake of *Myzus persicae* on an aphid resistant pepper accession. *BMC Plant Biol.* 18, 138. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1340-3>
- Takahama, U., 2004. Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: Physiological significance of the oxidation reactions. *Phytochem. Rev.* 3, 207–219. <https://doi.org/10.1023/B:PHYT.0000047805.08470.e3>
- Tang, S., Tang, G., Cheke, R.A., 2010. Optimum timing for integrated pest management: Modelling rates of pesticide application and natural enemy releases. *J. Theor. Biol.* 264, 623–638. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2010.02.034>
- Tariq, K., Noor, M., Backus, E.A., Hussain, A., Ali, A., Peng, W., Zhang, H., 2017. The toxicity of flonicamid to cotton leafhopper, *Amrasca biguttula* (Ishida), is by disruption of ingestion: an electropenetrography study. *Pest Manag. Sci.* 73, 1661–1669. <https://doi.org/10.1002/ps.4508>
- Tetreault, H.M., Grover, S., Scully, E.D., Gries, T., Palmer, N.A., Sarath, G., Louis, J., Sattler, S.E., 2019. Global Responses of Resistant and Susceptible Sorghum (*Sorghum bicolor*) to Sugarcane Aphid (*Melanaphis sacchari*). *Front. Plant Sci.* 10, 145.
- Tjallingii, W.F., 2006. Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. *J. Exp. Bot.* 57, 739–745. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj088>
- Tjallingii, W.F., 1994. Sieve element acceptance by aphids. *Eur. J. Entomol.* 91, 47–52.
- Tjallingii, W.F., 1990. Stylet penetration parameters from aphids in relation to host-plant resistance. *Insects-Plants* 89 411–419.
- Tjallingii, W.F., 1988. Electrical recording of stylet penetration activities. *Aphids Their Biol. Nat. Enemies Control* 95–108.
- Tjallingii, W.F., 1987. Stylet penetration activities by aphids: New correlations with electrical penetration graphs., in: *Insects-Plants*, V. Labeyrie, G. Fabres & D. Lachaise (Eds.). *Proc. 6th Int. Symp. Insect-Plant Relationships*, Pau 1986. W. Junk, Dordrecht. pp. 301–306.
- Tjallingii, W.F., 1985. Electrical nature of recorded signals during stylet penetration by aphids. *Entomol. Exp. Appl.* 38, 177–186. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1985.tb03516.x>
- Tjallingii, W.F., 1978a. Electronic Recording of Penetration Behaviour by Aphids. *Entomol. Exp. Appl.* 24, 721–730. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1978.tb02836.x>
- Tjallingii, W.F., 1978b. Mechanoreceptors of the Aphid Labium. *Entomol. Exp. Appl.* 24, 731–737. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1978.tb02837.x>
- Tjallingii, W.F., Esch, T.H., 1993. Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals. *Physiol. Entomol.* 18, 317–328. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1993.tb00604.x>
- Tolosa, T.A., Tamiru, A., Midega, C.A.O., Van Den Berg, J., Birkett, M.A., Woodcock, C.M., Bruce, T.J.A., Kelemu, S., Pickett, J.A., Khan, Z.R., 2019. Molasses Grass Induces Direct and Indirect Defense Responses in Neighbouring Maize Plants. *J. Chem. Ecol.* 45, 982–992. <https://doi.org/10.1007/s10886-019-01122-z>
- Tomova, B.S., Waterhouse, J.S., Doberski, J., 2005. The effect of fractionated Tagetes oil volatiles on aphid reproduction. *Entomol. Exp. Appl.* 115, 153–159. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2005.00291.x>
- Tooker, J.F., Douglas, M.R., Krupke, C.H., 2017. Neonicotinoid Seed Treatments: Limitations and Compatibility with Integrated Pest Management. *Agric. Environ. Lett.* 2. <https://doi.org/10.2134/aer2017.08.0026>
- Torres, J.B., Bueno, A. de F., 2018. Conservation biological control using selective insecticides – A valuable tool for IPM. *Biol. Control* 126, 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.07.012>

- Torres, J.B., Silva-Torres, C.S.A., Oliveira, J.V. de, 2003. Toxicity of pymetrozine and thiamethoxam to *Aphelinus gossypii* and *Delphastus pusillus*. *Pesqui. Agropecuária Bras.* 38, 459–466. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2003000400003>
- Tosh, C.R., Powell, G., Hardie, J., 2003. Decision making by generalist and specialist aphids with the same genotype. *J. Insect Physiol.* 49, 659–669. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(03\)00066-0](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(03)00066-0)
- Tosh, C.R., Powell, G., Hardie, J., 2002. Maternal reproductive decisions are independent of feeding in the black bean aphid, *Aphis fabae*. *J. Insect Physiol.* 48, 619–629. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(02\)00084-7](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(02)00084-7)
- Tougeron, K., Ferrais, L., Gardin, P., Lateur, M., Hance, T., 2022. Flower strips increase the control of rosy apple aphids after parasitoid releases in an apple orchard (preprint). *EcoEvoRxiv*. <https://doi.org/10.32942/osf.io/e4cjl>
- Tougeron, K., Iltis, C., Renoz, F., Albittar, L., Hance, T., Demeter, S., Le Goff, G.J., 2021. Ecology and biology of the parasitoid *Trechmites insidiosus* and its potential for biological control of pear psyllids. *Pest Manag. Sci.* 77, 4836–4847. <https://doi.org/10.1002/ps.6517>
- Tsao, R., Yang, R., Young, J.C., Zhu, H., 2003. Polyphenolic Profiles in Eight Apple Cultivars Using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). *J. Agric. Food Chem.* 51, 6347–6353. <https://doi.org/10.1021/jf0346298>
- Ullman, D.E., McLean, D.L., 1988. Feeding Behavior of the Winter-Form Pear Psylla, *Psylla pyricola* (Homoptera: Psyllidae), on Reproductive and Transitory Host Plants. *Environ. Entomol.* 17, 675–678. <https://doi.org/10.1093/ee/17.4.675>
- Umoru, P.A., Powell, W., 2002. Sub-lethal Effects of the Insecticides Pirimicarb and Dimethoate on the Aphid Parasitoid *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Braconidae) When Attacking and Developing in Insecticide-Resistant Hosts. *Biocontrol Sci. Technol.* 12, 605–614. <https://doi.org/10.1080/0958315021000016261>
- Vallat, A., Dorn, S., 2005. Changes in Volatile Emissions from Apple Trees and Associated Response of Adult Female Codling Moths over the Fruit-Growing Season. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4083–4090. <https://doi.org/10.1021/jf048499u>
- van Emden, H.F., 1972. Aphids as phytochemists. *Phytochem. Ecol.* 25–43.
- van Ham, R.C.H.J., Kamerbeek, J., Palacios, C., Rausell, C., Abascal, F., Bastolla, U., Fernández, J.M., Jiménez, L., Postigo, M., Silva, F.J., Tamames, J., Viguera, E., Latorre, A., Valencia, A., Morán, F., Moya, A., 2003. Reductive genome evolution in *Buchnera aphidicola*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 581–586. <https://doi.org/10.1073/pnas.0235981100>
- van Helden, M., Tjallingii, W.F., 1993. Tissue localisation of lettuce resistance to the aphid *Nasonovia ribisnigri* using electrical penetration graphs. *Entomol. Exp. Appl.* 68, 269–278. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1993.tb01713.x>
- van Tol, R.W.H.M., Helsen, H.H.M., Griepink, F.C., de Kogel, W.J., 2009. Female-induced increase of host-plant volatiles enhance specific attraction of aphid male *Dysaphis plantaginea* (Homoptera: Aphididae) to the sex pheromone. *Bull. Entomol. Res.* 99, 593–602. <https://doi.org/10.1017/S0007485309006634>
- VanWoerkom, A.H., Aćimović, S.G., Sundin, G.W., Cregg, B.M., Mota-Sanchez, D., Vandervoort, C., Wise, J.C., 2014. Trunk injection: An alternative technique for pesticide delivery in apples. *Crop Prot.* 65, 173–185. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.05.017>
- Veberic, R., Trobec, M., Herbinger, K., Hofer, M., Grill, D., Stampar, F., 2005. Phenolic compounds in some apple (*Malus domestica* Borkh) cultivars of organic and integrated production. *J. Sci. Food Agric.* 85, 1687–1694. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2113>

- Verkerk, R.H.J., Wright, D.J., 1996. Effects of interactions between host plants and selective insecticides on larvae of *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae) in the laboratory. *Pestic. Sci.* 46, 171–181. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199602\)46:2<171::AID-PS333>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199602)46:2<171::AID-PS333>3.0.CO;2-7)
- Vincent, C., Babendreier, D., Świergiel, W., Helsen, H., Blommers, L.H.M., 2019. A review of the apple sawfly, *Hoplocampa testudinea* (Hymenoptera Tenthredinidae). *Bulletin of Insectology* 72, 35–54.
- Vogt, H., Weigel, A., 1999. Is it possible to enhance the biological control of aphids in an apple orchard with flowering strips? *Integr. Plant Prot. Orchards IOBCwprs Bull.* 22, 39–46.
- Walia, M., Mann, T.S., Kumar, D., Agnihotri, V.K., Singh, B., 2012. Chemical Composition and *In Vitro* Cytotoxic Activity of Essential Oil of Leaves of *Malus domestica* Growing in Western Himalaya (India). *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2012, 649727. <https://doi.org/10.1155/2012/649727>
- Walker, G.P., 2000. A beginner's guide to electronic monitoring of homopteran probing behavior, in: *Principles and Applications of Electronic Monitoring and Other Techniques in the Study of Homopteran Feeding Behavior.*, Entomological Society of America. pp. 14–40.
- Walling, L.L., 2000. The Myriad Plant Responses to Herbivores. *J. Plant Growth Regul.* 19, 195–216. <https://doi.org/10.1007/s003440000026>
- Wang, F., Park, Y.-L., Gutensohn, M., 2020. Glandular trichome-derived sesquiterpenes of wild tomato accessions (*Solanum habrochaites*) affect aphid performance and feeding behavior. *Phytochemistry* 180, 112532. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112532>
- Wangari Nderitu, P., Jonsson, M., Arunga, E., Otieno, M., Jamleck Muturi, J., Wafula, G.O., 2020. Combining Host Plant Resistance, Selective Insecticides, and Biological Control Agents for Integrated Management of *Tuta absoluta*. *Adv. Agric.* 2020, e6239491. <https://doi.org/10.1155/2020/6239491>
- War, A.R., Paulraj, M.G., War, M.Y., Ignacimuthu, S., 2011a. Herbivore- and Elicitor- Induced Resistance in Groundnut to Asian armyworm, *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Plant Signal. Behav.* 6, 1769–1777. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17323>
- War, A.R., Paulraj, M.G., War, M.Y., Ignacimuthu, S., 2011b. Jasmonic Acid-Mediated-Induced Resistance in Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) Against *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Plant Growth Regul.* 30, 512–523. <https://doi.org/10.1007/s00344-011-9213-0>
- War, A.R., Sharma, H.C., Paulraj, M.G., War, M.Y., Ignacimuthu, S., 2011c. Herbivore induced plant volatiles: Their role in plant defense for pest management. *Plant Signal. Behav.* 6, 1973–1978. <https://doi.org/10.4161/psb.6.12.18053>
- Warneys, R., Gaucher, M., Robert, P., Aligon, S., Anton, S., Aubourg, S., Barthes, N., Braud, F., Cournol, R., Gadenne, C., Heintz, C., Brisset, M.-N., Degrave, A., 2018. Acibenzolar-S-Methyl Reprograms Apple Transcriptome Toward Resistance to Rosy Apple Aphid. *Front. Plant Sci.* 9, 1795.
- Watanabe, H., Fukami, J., 1977. Stimulating Action of Chlordimeform and Desmethylechlordimeform on Motor Discharges of Armyworm, *Leucania separata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Pestic. Sci.* 2, 297–302.
- Weber, D., Egan, P.A., Muola, A., Ericson, L.E., Stenberg, J.A., 2020. Plant resistance does not compromise parasitoid-based biocontrol of a strawberry pest. *Sci. Rep.* 10, 5899. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62698-1>
- Webster, B., Bruce, T., Dufour, S., Birkemeyer, C., Birkett, M., Hardie, J., Pickett, J., 2008. Identification of Volatile Compounds Used in Host Location by the Black Bean Aphid,

- Aphis fabae*. J. Chem. Ecol. 34, 1153–1161. <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9510-7>
- Wensler, R.J., Filshie, B.K., 1969. Gustatory sense organs in the food canal of aphids. J. Morphol. 129, 473–491. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051290406>
- Werrie, P.-Y., Burgeon, C., Le Goff, G.J., Hance, T., Fauconnier, M.-L., 2021. Biopesticide Trunk Injection Into Apple Trees: A Proof of Concept for the Systemic Movement of Mint and Cinnamon Essential Oils. Front. Plant Sci. 12, 650132.
- Werrie, P.-Y., Juillard, A., Heintz, C., Brisset, M.-N., Fauconnier, M.-L., 2022. Phytotoxicity and Plant Defence Induction by *Cinnamomum cassia* Essential Oil Application on *Malus domestica* Tree: A Molecular Approach. Agronomy 12, 512. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020512>
- Wheeler, C.E., Vandervoort, C., Wise, J.C., 2020. Organic Control of Pear Psylla in Pear with Trunk Injection. Insects 11, 650. <https://doi.org/10.3390/insects11090650>
- Whitehead, S.R., Turcotte, M.M., Poveda, K., 2016. Domestication impacts on plant – herbivore interactions: a meta-analysis 372, 20160034.
- Will, T., Tjallingii, W.F., Thönnessen, A., van Bel, A.J.E., 2007. Molecular sabotage of plant defense by aphid saliva. Proc. Natl. Acad. Sci. 104, 10536–10541. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703535104>
- Will, T., van Bel, A.J.E., 2006. Physical and chemical interactions between aphids and plants. J. Exp. Bot. 57, 729–737. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj089>
- Wyss, P., Bolsinger, M., 1997. Translocation of Pymetrozine in Plants. Pestic. Sci. 50, 195–202. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199707\)50:3<195::AID-PS581>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199707)50:3<195::AID-PS581>3.0.CO;2-D)
- Xue, K., Deng, S., Wang, R., Yan, F., Xu, C., 2008. Leaf surface factors of transgenic Bt cotton associated with the feeding behaviors of cotton aphids: A case study on non-target effects. Sci. China C Life Sci. 51, 145–156. <https://doi.org/10.1007/s11427-008-0028-6>
- Yang, S.Y., Lim, D.J., Noh, M.Y., Kim, J.C., Kim, Y.C., Kim, I.S., 2017. Characterization of biosurfactants as insecticidal metabolites produced by *Bacillus subtilis* Y9. Entomological Research 47, 55–59. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12200>
- Yin, J.-L., Xu, H.-W., Wu, J.-C., Hu, J.-H., Yang, G.-Q., 2008. Cultivar and Insecticide Applications Affect the Physiological Development of the Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Hemiptera: Delphacidae). Environ. Entomol. 37, 206–212. [https://doi.org/10.1603/0046-225X\(2008\)37\[206:CAIAAT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0046-225X(2008)37[206:CAIAAT]2.0.CO;2)
- Yorozuya, H., 2017. Analysis of tea plant resistance to tea green leafhopper, *Empoasca onukii*, by detecting stylet-probing behavior with DC electropenetrography. Entomol. Exp. Appl. 165, 62–69. <https://doi.org/10.1111/eea.12621>
- Youn, Y., Backus, E.A., Serikawa, R.H., Stelinski, L.L., 2011. Correlation of an Electrical Penetration Graph Waveform with Walking by Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). Fla. Entomol. 94, 1084–1087. <https://doi.org/10.1653/024.094.0456>
- Yu, X., Killiny, N., 2018. RNA interference of two glutathione S-transferase genes, *Diaphorina citri* DcGSTe2 and DcGSTd1, increases the susceptibility of Asian citrus psyllid (Hemiptera: Liviidae) to the pesticides fenpropathrin and thiamethoxam. Pest Manag. Sci. 74, 638–647. <https://doi.org/10.1002/ps.4747>
- Yuan, H.-B., Li, J.-H., Liu, Y.-Q., Cui, L., Lu, Y.-H., Xu, X.-Y., Li, Z., Wu, K.-M., Desneux, N., 2017. Lethal, sublethal and transgenerational effects of the novel chiral neonicotinoid pesticide cycloxaprid on demographic and behavioral traits of *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae). Insect Sci. 24, 743–752. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12357>

- Yun, D.C., Yang, S.Y., Kim, Y.C., Kim, I.S., Kim, Y.H., 2013. Identification of surfactin as an aphicidal metabolite produced by *Bacillus amyloliquefaciens* G1. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 56, 751–753. <https://doi.org/10.1007/s13765-013-3238-y>
- Zhang, C., Shi, H., Chen, L., Wang, X., Lü, B., Zhang, S., Liang, Y., Liu, R., Qian, J., Sun, W., You, Z., Dong, H., 2011. Harpin-induced expression and transgenic overexpression of the phloem protein gene AtPP2-A1 in Arabidopsis repress phloem feeding of the green peach aphid *Myzus persicae*. BMC Plant Biol. 11, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-11>
- Zhao, L., Dai, W., Zhang, C., Zhang, Y., 2010. Morphological characterization of the mouthparts of the vector leafhopper *Psammotettix striatus* (L.) (Hemiptera: Cicadellidae). Micron 41, 754–759. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2010.06.001>
- Zytynska, S.E., Weisser, W.W., 2016. The natural occurrence of secondary bacterial symbionts in aphids. Ecol. Entomol. 41, 13–26. <https://doi.org/10.1111/een.12281>

Résumé : La capacité à s'alimenter constitue un élément clef dans le succès de colonisation des plantes hôtes par les Hémiptères phloémophages et dans un contexte agronomique, un potentiel facteur explicatif de la prolifération des ravageurs dans une culture. Dans ce travail de thèse, nous souhaitons donc évaluer si l'efficacité de différentes méthodes de contrôle des Hémiptères phloémophages de vergers (*Dysaphis plantaginea* et *Cacopsylla pyri*), et plus particulièrement (1) de l'utilisation d'huiles essentielles, (2) du recours à des biopesticides et (3) de l'utilisation de plantes résistantes, peut être expliquée par les modifications du comportement alimentaire et plus globalement, par des modifications en termes de préférence et de performance du ravageur. Pour certaines de ces méthodes de contrôle nous avons aussi étudié leurs effets sur le troisième niveau trophique, et plus particulièrement les parasitoïdes, afin d'évaluer si elles pouvaient impacter la régulation des Hémiptères phloémophages par les ennemis naturels. Le premier levier impliquant l'utilisation d'huiles essentielles a mis en avant des effets contrastés sur la préférence (orientation, comportement alimentaire) et la performance des insectes suivant le mode d'application (par diffusion dans l'air ou par injection dans le tronc) et aussi suivant l'insecte ciblé (*D. plantaginea* ou *C. pyri*). L'objectif lié au second levier était de caractériser les effets létaux et sublétaux de biopesticides bactériens (lipopeptides) sur deux espèces de pucerons (*D. plantaginea* et *Aphis fabae*) et à étudier ces effets sur le troisième niveau trophique. Les résultats ont révélé que les pucerons *D. plantaginea* ayant survécu à l'exposition des lipopeptides les plus aphicides (Surfactines) avaient une durée d'ingestion de sève plus importante que les pucerons non exposés, tandis que l'inverse était observé pour les pucerons *A. fabae*. Cependant, le comportement de sélection de l'hôte par les femelles parasitoïdes *Aphidius matricariae* n'a pas été impacté suite à l'exposition des pucerons *A. fabae*. Enfin, concernant le troisième levier il s'agissait d'étudier les effets de la résistance des pommiers sur la préférence et la performance de *D. plantaginea* en s'intéressant à *Malus domestica* (comparaison de variétés) et à l'espèce sauvage *Malus sylvestris*, contributrice de la domestication du pommier (comparaison de populations). Dans ce contexte de résistance des plantes, nous avons voulu comprendre dans quelle mesure le comportement alimentaire de *D. plantaginea* pouvait être un élément explicatif des effets bottom-up du pommier domestique sur les parasitoïdes. Nous avons aussi émis l'hypothèse qu'il existait un lien entre la structuration génétique des pommiers sauvages et le comportement alimentaire de *D. plantaginea*. Les résultats ont révélé que la résistance des pommiers domestiques et sauvages a eu peu d'effet sur la performance des pucerons *D. plantaginea*, bien qu'elle ait affecté leur comportement alimentaire. Tandis que le comportement alimentaire semblait en effet constituer un facteur explicatif des effets bottom-up des variétés de pommier domestique *M. domestica* sur les parasitoïdes *Ephedrus cerasicola*, le lien entre le comportement alimentaire de *D. plantaginea* et la structuration génétique des pommiers sauvages européens *M. sylvestris* est apparu plus faible. Ces travaux soulignent l'importance de l'étude du comportement alimentaire des Hémiptères phloémophages pour valider ou infirmer l'efficacité de méthodes alternatives à l'utilisation de pesticides chimiques conventionnels dans le contrôle des ravageurs.

Mots-clés : Lutte intégrée, Vergers, Pucerons, Psylles, Parasitoïdes, Interactions multi-trophiques, Électro-pénétrographie, Comportement, Traits d'histoire de vie, Résistance des plantes, Biopesticides.

Abstract: Feeding ability is a key element in the successful colonisation of host plants by phloemophagous Hemiptera and, in an agronomical context, a potential explanatory factor of pest proliferation in a crop. In this thesis, we therefore wish to evaluate whether the effectiveness of different methods of controlling phloemophagous Hemiptera in orchards (*Dysaphis plantaginea* and *Cacopsylla pyri*), namely the use of (1) essential oils, (2) biopesticides and (3) resistant plants, can be explained by changes in feeding behaviour and, more globally, by changes in pest preference and performance. For some of these control methods we also studied their effects on the third trophic level, and more specifically on parasitoids, in order to assess whether they could impact the regulation of phloemophagous Hemiptera by natural enemies. The first lever involving the use of essential oils revealed contrasting effects on the preference (orientation, feeding behaviour) and performance of the insects depending on the mode of application (by diffusion in the air or by injection in the trunk) and also depending on the targeted insect (*D. plantaginea* or *C. pyri*). The objective related to the second lever was to characterise the lethal and sublethal effects of bacterial biopesticides (lipopeptides) on two aphid species (*D. plantaginea* and *Aphis fabae*) and to study these effects on the third trophic level. The results revealed that *D. plantaginea* aphids that survived exposure to the most aphicidal lipopeptides (Surfactins) had a longer duration of sap ingestion than unexposed aphids, while the reverse was observed for *A. fabae* aphids. However, the host selection behaviour of *Aphidius matricariae* female parasitoids was not impacted by the exposure of *A. fabae* aphids. Finally, for the third lever the purpose was to study the effects of apple resistance on the preference and performance of *D. plantaginea* by focusing on *Malus domestica* (comparison of varieties) and a contributor to apple domestication, the wild species *Malus sylvestris* (comparison of populations). In this context of plant resistance, we sought to understand to what extent the feeding behaviour of *D. plantaginea* could be an explanatory element for the bottom-up effects of domesticated apple on parasitoids. We also hypothesised there was a link between the genetic structuring of wild apple trees and the feeding behaviour of *D. plantaginea*. The results revealed that resistance in both domestic and wild apple trees had little effect on the performance of *D. plantaginea* aphids, although it did affect their feeding behaviour. While the feeding behaviour did indeed seem to be a factor explaining the bottom-up effects of *M. domestica* domestic apple varieties on *Ephedrus cerasicola* parasitoids, the link between the feeding behaviour of *D. plantaginea* and the genetic structuring of wild European apple trees *M. sylvestris* appeared weaker. This work underlines the importance of studying the feeding behaviour of phloemophagous Hemiptera to validate or invalidate the effectiveness of alternative methods to the use of conventional chemical pesticides in pest control.

Key words: Integrated Pest Management, Orchards, Aphids, Psyllids, Parasitoids, Multi-trophic interactions, Electro-penetrography, Behavior, Life history traits, Plant resistance, Biopesticides.