



Université de Montréal

**Les routes d'invasion du criocère du lis (*Lilioceris lili*)  
en Amérique du Nord**

par  
Alessandro Dieni

Département de sciences biologiques  
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des arts et des sciences  
en vue de l'obtention du grade de maître ès (M.Sc.)  
en sciences biologiques

Novembre, 2014

© Alessandro Dieni, 2014

## Résumé

Le criocère du lis, *Lilioceris lili* (Coleoptera : Chrysomelidae), un ravageur de lis et de fritillaires d'origine eurasienne, a été observé pour la première fois en Amérique du Nord en 1943 sur l'île de Montréal au Canada. Après y avoir été confiné pendant environ 25 années, ce coléoptère a par la suite progressé rapidement sur le territoire nord-américain. Actuellement, on l'observe dans huit provinces canadiennes et huit états américains. Cette étude a investigué les routes d'invasion utilisées par le criocère du lis au Canada et aux États-Unis avec l'aide de marqueurs génétiques AFLP. Pour ce faire, 516 individus parmi 34 sites en Amérique du Nord et en Europe ont été échantillonnés et analysés.

Le premier objectif était de déterminer, en analysant la structure génétique des populations nord-américaines, s'il y avait eu une ou plusieurs introductions en provenance d'Europe. Le deuxième objectif était d'identifier l'origine de la ou des populations introduites en Amérique du Nord. Finalement, le troisième objectif consistait à proposer un scénario d'invasion de *L. lili* en Amérique du Nord basé sur les données de première mention et de structure génétique des populations échantillonnées.

Les résultats démontrent une signature génétique distincte entre les criocères du lis du Canada et ceux des États-Unis, suggérant ainsi deux sources d'introductions indépendantes en Amérique du Nord, soit une première introduction à Montréal, Québec, dans les années 1940 et une seconde aux États-Unis au début des années 1990 à Cambridge, Massachusetts. De plus, les deux populations nord-américaines semblent provenir de différentes régions du nord de l'Europe, ce qui est conséquent avec le scénario suggérant deux sources d'introductions indépendantes. Chacune des populations aurait par la suite progressé respectivement dans leur pays d'introduction selon une dispersion de type stratifiée. En effet, la progression continue de *L. lili* dans certaines régions suggère une dispersion naturelle de l'espèce sur le territoire nord-américain, alors que la progression rapide sur de longues distances semble être causée par le transport anthropique de lis contaminés.

**Mots-clés :** Criocère du lis, *Lilioceris lili*, espèce envahissante, routes d'invasion, AFLP, génétique des populations, analyse de regroupement génétique, assignation populationnelle

## Abstract

The lily leaf beetle, *Lilioceris lili* (Coleoptera : Chrysomelidae), a Eurasian pest of lilies and fritillaries, was first observed in North America in 1943 on the Island of Montréal, Canada. After being confined to Montréal for approximately 25 years, the beetle quickly progressed in North America, and is currently present in eight Canadian provinces and eight American states. During this study, we have investigated the routes of invasion followed by *L. lili* in North America, using AFLP markers. We sampled and analysed 516 individuals from 34 sites across North America and Europe.

Our first objective was to characterize the genetic structure of North American *L. lili* populations to determine if they originated from a single or from multiple introductions from Europe. The second objective was to identify the geographical origin of the invasive population(s). Finally, the third objective was to trace back the geographical routes of invasion of *L. lili* in North America, using information from both the dates of first observations and the genetic structure of sampled populations.

Our results showed clear genetic difference between individuals from Canada and the USA, suggesting at least two different sources of introductions of *L. lili* in North America. A first episode of introduction took place in Montréal, Canada in the 1940's while a second introduction occurred in Cambridge, Massachusetts, around 1990. Also, both North American populations seem to originate from different populations in northern Europe, which support the hypothesis of two distinct sources of introduction. Each population next progressed in its respective country following a stratified dispersal. Indeed, continuous progression of the beetle in some regions of North America suggests a pattern of natural dispersion, while human-mediated carrying of infected lilies seemed to be responsible for the long-range movement of the beetle.

**Keywords** : Lily leaf beetle, *Lilioceris lili*, invasive species, routes of invasion, AFLP, populations genetic, genetic clustering analysis, population allocation

# Table des matières

Résumé .....	iii
Abstract .....	v
Table des matières .....	vii
Liste des tableaux .....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations, sigles et symboles.....	xii
Remerciements.....	xv
Avant-propos.....	1
<b>1. Introduction générale.....</b>	<b>3</b>
Espèces exotiques envahissantes .....	3
Importance de retracer les routes d'invasion.....	4
Méthodes pour retracer les routes d'invasion.....	6
Biologie du criocère du lis.....	9
Distribution mondiale du criocère du lis.....	11
Objectifs de l'étude .....	16
Références .....	17
<b>2. ROUTES OF INVASION OF THE LILY LEAF BEETLE, <i>LILIOCERIS LILII</i> (SCOPOLI), IN     NORTH AMERICA .....</b>	<b>23</b>
Abstract .....	23
Introduction.....	24
Material and methods.....	26
Biological material.....	26
Genetic characterization .....	27
Data analysis .....	30
Results.....	31
Genetic clustering.....	31
Population allocation.....	33

Genetic differentiation and diversity.....	34
<b>Discussion.....</b>	<b>36</b>
Two sources of introduction .....	37
Pattern of dispersal along two separate routes of invasion .....	39
<b>Conclusions and perspectives.....</b>	<b>41</b>
<b>Acknowledgements .....</b>	<b>43</b>
<b>Appendix SI – Genetic clustering complementary analysis.....</b>	<b>44</b>
<b>Appendix SII – Genetic differentiation between sampling sites .....</b>	<b>51</b>
<b>References .....</b>	<b>52</b>
<b>3. Conclusion générale .....</b>	<b>57</b>
<b>Références .....</b>	<b>60</b>
<b>Annexe I : Caractérisation de l’infection de <i>Lilioceris lili</i> par l’endosymbiote <i>Wolbachia</i> en Amérique du Nord et en Europe.....</b>	<b>xvii</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>xvii</b>
<b>Méthodologie.....</b>	<b>xviii</b>
Échantillonnage .....	xviii
Extraction d’ADN.....	xx
Conditions PCR.....	xx
<b>Résultats.....</b>	<b>xxi</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>xxii</b>
<b>Références .....</b>	<b>xxiii</b>



## Liste des tableaux

<b>Table 2.1</b> Description of sampling locations for <i>L. lili</i> in Europe and North America, sample sizes, and indices of genetic diversity (PLP: proportion of polymorphic loci, H <sub>j</sub> : Nei's gene diversity, SE: standard error).....	<b>29</b>
<b>Table 2.2</b> Pairwise F <sub>ST</sub> estimates between <i>L. lili</i> genetic clusters in Europe and North America. Adjusted significant p-values, following the sequential Bonferroni correction technique (Rice 1989), are indicated above the diagonal. ....	<b>34</b>
<b>Table A2.1</b> Pairwise F <sub>ST</sub> values calculated by ARLEQUIN for all locations sampled. P-values were obtained by comparing observed F <sub>ST</sub> estimates with a null distribution created by 1000 random permutations. Significance levels were adjusted following the sequential Bonferroni correction technique (Rice 1989). Bold values represent non-significant F <sub>ST</sub> values.....	<b>51</b>
<b>Tableau A3.1</b> Liste des sites d'échantillonnage de <i>L. lili</i> en Europe et en Amérique du Nord, nombre d'individus échantillonnés par site et résultats des analyses d'infection par <i>Wolbachia</i> avec les paires d'amorces 16S spécifiques à <i>Wolbachia</i> . ....	<b>xix</b>

## Liste des figures

- Fig. 1.1** Cricocère du lis (*Lilicercis lili*) adulte.....10
- Fig. 1.2** Distribution mondiale de *L. lili*. Les superficies en jaune représentent l'aire native ou naturalisée; celles en vert l'aire envahie en Eurasie et celles en bleu l'aire envahie en Amérique du Nord. L'information provient de l'Invasive Species Compendium (ISC) (CABI 2014) et des données récoltées durant la réalisation de ce projet.....12
- Fig. 1.3** Distribution de *L. lili* dans les provinces maritimes du Canada (a) et dans l'état du Maine (b) (Majka et Kirby 2011). Les points représentent les dates de première mention de *L. lili* à une localité donnée. Les flèches rouges représentent le flux probable de propagation de *L. lili*, selon les dates de premières mentions, sur le territoire à partir d'Halifax. Les flèches bleues représentent le flux probable de propagation de *L. lili* sur le territoire à partir du sud du Maine, États-Unis.....15
- Fig. 2.1** Sampling locations for *L. lili* in (a) Europe and (b) North America. ....28
- Fig. 2.2** Clustering of *L. lili* genotypes from (a) North America, (b) Europe and (c) North America and Europe provided by STRUCTURE for K = 2. Locations are presented following a west to east gradient. ....32
- Fig. 2.3** Principal Coordinate Analysis (PCoA) based on the mean genetic distance between 34 locations where *L. lili* was sampled in Europe and North America. Symbols represent sampled regions. Locations not clearly clustering within their regions are identified (AmNB, EuBG, EuFR, and EuCH; see Table 2.1).....33
- Fig. 2.4** Allocation of *L. lili* AFLP individual genotypes from the Canada cluster and the USA cluster to European locations. A minimum log-likelihood difference (MLD) of 1 was used as a threshold for allocation in AFLPOP v1.2. ....34

**Fig. 2.5** Genetic diversity of *L. lili* estimated for each location in (a) Europe and (b) North America. The dark areas of pie charts represent the proportion of polymorphic loci (PLP) at each location. The color of pie charts represents the genetic cluster of each locations (yellow: Northern Europe, red: Southern Europe, green: Canada, blue: USA). When available, years of first observation of *L. lili* in North America are indicated next to each location. ....**36**

**Fig. A1.1**  $\Delta K$  for each K values according to the guidelines provided by Evanno *et al.* (2005) for the North American individuals. Preferred value of K = 2. ....**45**

**Fig. A1.2** Mean L(K) ( $\pm$ SD) for each K values according to the guidelines provided by Pritchard *et al.* (2000) for the North American individuals. Preferred value of K=4. ....**46**

**Fig. A1.3**  $\Delta K$  for each K values according to the guidelines provided by Evanno *et al.* (2005) for the European individuals. Preferred value of K = 2. ....**47**

**Fig. A1.4** Mean L(K) ( $\pm$ SD) for each K values according to the guidelines provided by Pritchard *et al.* (2000) for the European individuals. Preferred value of K = 3...**48**

**Fig. A1.5**  $\Delta K$  for each K values according to the provided by Evanno *et al.* (2005) for all individuals. Preferred value of K = 2.....**49**

**Fig. A1.6** Mean L(K) ( $\pm$ SD) for each K values according to the guidelines provided by Pritchard *et al.* (2000) for all individuals. Preferred value of K = 2. ....**50**

**Fig. A3.1** Exemple de dépistage de *Wolbachia* chez *L. lili* sur gel d'agarose 2% teinté de bromure d'éthidium. Puits 1 à 8 = individus EuFR 1 à 8, puits 9 à 12 = individus EuSE 1 à 4, puits 13 et 14 = témoins positifs (*Nasonia* infecté par *Wolbachia*, Na +), puits 15 = témoin négatif (*Nasonia* non-infecté, Na -), puits 16 = H<sub>2</sub>O, puits 17 = échelle 100pb et puits 19 à 25 = individus AmNB 1 à 8. Les flèches vertes indiquent les fragments de 438pb, qui représentent l'amplification d'un fragment d'ADN de *Wolbachia*. ....**xxi**

## Liste des abréviations, sigles et symboles

ACoP	Analyse en coordonnées principales / Principal coordinate analysis (PCoA)
ADN	Acide désoxyribonucléique / deoxyribonucleic acid (DNA)
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
EEE	Espèces exotiques envahissantes / invasive alien species
EtOH	Alcool éthylique / ethyl alcohol
et al.	Et les autres ou « et collaborateurs » / and others ( <i>Et alii</i> )
e.g.	Par exemple / for example ( <i>exempli gratia</i> )
Fig.	Figure
F <sub>ST</sub>	Indice de fixation / fixation index
H <sub>j</sub>	Indice de diversité génétique de Nei / Nei's gene diversity
Inc.	Incorporée / Incorporation
K	Nombre de groupes génétiques / number of genetic groups
km	Kilomètre / kilometer
L(K)	Estimate of the posterior probability of the data for a given K
ΔK	Second order rate of change of the likelihood function with respect to K
min	Minute / minute
MLD	Minimal log-likelihood difference
μL	Microlitre / microliter
mm	Millimètre / millimeter
mM	Millimolaire / millimolar
μM	Micromolaire / micromolar
ng	Nanogramme
PCR	Polymerase chain reaction
PLP	Proportion de loci polymorphique / proportion of polymorphic loci
pb	Paire de base / base pair
s	Seconde / second
SD	Écart-type / standard deviation
SE	Erreur standard / standard error

sp.	Espèce / Species
X	Fraction molaire / mole fraction
v.	Version
vs.	Versus
&	Esperluette signifiant « et » / Ampersand meaning "and"
%	Pourcentage / percentage
°C	Degrés Celsius / degrees Celsius
±	Plus ou moins / more or less
<	Plus petit que / less than
≤	Plus petit ou égal à / less than or equal to
~	Approximativement / approximately
®	Marque déposée / registered trademark
ρ	Probabilité / probability (p-value)
\$	Dollar

*« ... pour aller de l'avant, il faut savoir aussi d'où  
l'on vient. »*

**Fernand Braudel, 1972**

## Remerciements

Cette étude a été réalisée grâce au support financier du programme de Chaire de Recherche du Canada.

Je remercie grandement Jacques Brodeur, directeur de recherche, et Julie Turgeon, codirectrice, pour leur confiance et leurs judicieux conseils tout au long de ce projet.

J'aimerais aussi remercier les personnes qui ont participé à la réalisation de mon projet. Merci à Josée Doyon, professionnelle de recherche du laboratoire d'entomologie de Jacques Brodeur à l'IRBV, pour sa disponibilité et sa patience. Un gros merci à Alexandra Saad et Alexandre Leblanc, mes chasseurs de criocères du lis. Merci à Audrey Bourret, Geneviève Parent et Éric Devost, pour leur précieuse aide et support dans le laboratoire de génétique moléculaire de Julie Turgeon à l'Université Laval. Je ne pourrai jamais remercier suffisamment Xavier Prairie pour tout le temps et l'effort qu'il a mis dans le déchiquetage de mes bêtes.

J'aimerais spécialement remercier toutes les personnes qui ont pris le temps de récolter des criocères du lis dans leur jardin, au travail ou dans des parcs et de me les envoyer :

Bradford Jones et M. Mooney (Alberta), Brent Elliot et Robert J. Lamb (Manitoba), Donna Evans, Karine Savard, Jean LeSage et Kevin Barber (Ontario), Danielle Thibodeau et S. Boucher (Québec), Pat McKinney (Nouveau-Brunswick), Christopher G. Majka (Nouvelle-Écosse), C. Youngerman (Île-du-Prince-Édouard), Barry Hicks (Terre-Neuve), Kathleen Caso (Maine), Rose T. Hiskes (Connecticut), Elena Olsen (Rhode Island), Collen Donahue (Washington), Jean-Louis Hemptinne (France), Andrew Salisbury et Cara Smith (Angleterre), Geoff Hancock (Écosse), Björn Rulik et Gisela Haye (Allemagne), A.B. Allema, P.W. deJong et Sam Jeltje (Les Pays-Bas), Brigitta Ramert (Suède) and Tim Haye (Suisse).

Sans votre précieuse collaboration, je n'aurais pas pu réaliser ce projet.

Enfin, j'aimerais remercier ma famille et mes amis d'avoir été patients et compréhensifs avec moi durant mes angoisses de deuxième cycle universitaire.



## Avant-propos

Les impacts négatifs des espèces envahissantes sur l'environnement, la biodiversité locale et les services écosystémiques sont mondialement reconnus. Afin de limiter ces impacts, il est important de rapidement développer des stratégies efficaces pour prévenir l'introduction de telles espèces et mieux gérer les espèces déjà établies. Cependant, pour mettre en place ces stratégies, il faut en premier lieu reconstituer les routes d'invasions des espèces exotiques envahissantes. Cela implique de déterminer le nombre de populations ayant été introduites dans le nouveau territoire, de retracer le plus précisément possible l'origine géographique de la ou des populations sources et finalement de comprendre la progression des populations envahissantes sur le territoire envahi. La présente étude tente d'élucider l'historique d'invasion du criocère du lis, *Lilioceris lili* Scopoli, un coléoptère (Chrysomelidae) d'origine eurasienne maintenant présent dans presque toutes les provinces canadiennes et dans plusieurs régions des États-Unis. Bien que la progression de l'espèce sur le territoire nord-américain depuis sa première observation à Montréal en 1943 fut bien documentée, plusieurs questions subsistent. Nous ignorons comment et pourquoi l'insecte a progressé si rapidement en Amérique du Nord après avoir été confiné pendant environ 25 ans sur l'île de Montréal. De plus, il reste à déterminer si cette progression rapide a été causée uniquement par la population montréalaise, ou si d'autres introductions de l'espèce en Amérique du Nord ont contribué à l'envahissement du territoire par *L. lili*.

Ce mémoire débute par une introduction générale, sous la forme d'une revue de littérature, sur l'ensemble de la problématique des espèces exotiques envahissantes, les routes d'invasions et le système biologique en question, soit le criocère du lis. Il s'ensuit un article scientifique regroupant l'essentiel de nos résultats sur la structure génétique du criocère du lis en Amérique du Nord et en Europe, et sur les routes d'invasion probables de *L. lili* en Amérique du Nord. Cet article sera soumis à la revue scientifique *Biological Invasions*. Une conclusion générale complète le mémoire. En annexe, je présente une partie des résultats obtenus sur le taux d'infection par la bactérie intracellulaire *Wolbachia* sp. chez *L. lili*.

L'ensemble de l'étude a été élaboré avec la participation des co-auteurs de l'article scientifique, Mme Julie Turgeon et M. Jacques Brodeur. Les prises de données sur le terrain, les manipulations au laboratoire de l'Université Laval et les analyses statistiques ont été réalisées par moi-même. J'ai aussi procédé à la quête de spécimens de *L. lili* en Amérique du Nord et en Eurasie, avec l'aide de nombreux contacts et des co-auteurs. En tant que premier auteur de l'article scientifique, j'ai structuré et rédigé la première version de chacune des parties de ce document. Les co-auteurs ont ensuite complété l'information et révisé l'ensemble de l'article. Il en va de même pour les autres sections de ce mémoire de maîtrise.

# 1. Introduction générale

## Espèces exotiques envahissantes

Une invasion biologique se produit lorsqu'un organisme envahit un nouveau territoire, souvent loin de celui d'origine, et que les descendants de cet organisme, sur plusieurs générations, réussissent à proliférer, progresser et persister sur ce nouveau territoire (Elton 1958; Guillemaud *et al.* 2011). Ce phénomène écologique a été accéléré par les activités humaines; l'expansion mondiale du transport et du commerce étant directement responsable de l'augmentation drastique de l'échelle géographique, de la fréquence et du nombre d'espèces impliquées dans les récentes invasions biologiques (Wells *et al.* 1986; di Castri 1989; Mack *et al.* 2000; Pimentel *et al.* 2001).

Les espèces exotiques envahissantes (EEE) sont maintenant reconnues à travers le monde comme étant parmi les menaces écologiques et économiques les plus importantes du nouveau millénaire (Pimentel 2002). Les EEE peuvent avoir des effets néfastes au niveau de la biodiversité du territoire envahi, de la production de plusieurs systèmes agricoles et forestiers, du maintien des différents services écosystémiques et de la santé humaine (Mack *et al.* 2000; Pimentel *et al.* 2001; Pejchar et Mooney 2009; Donovan *et al.* 2013). Les pertes économiques directes et indirectes liées aux espèces envahissantes peuvent être faramineuses. Au Canada, le rapport 2005-2012 du Programme de partenariat sur les EEE (Environnement Canada 2012) estime les coûts annuels liés aux espèces envahissantes à \$20 milliards dans le secteur forestier, à \$7 milliards pour les espèces aquatiques envahissantes dans les Grands Lacs et à \$2,2 milliards pour les plantes envahissantes dans le secteur agricole.

Le développement de stratégies efficaces pour prévenir l'introduction et l'établissement des EEE et pour mieux contrôler les espèces déjà établies sur le territoire s'avère nécessaire afin de limiter les problèmes mentionnés ci-haut. Cependant, pour y arriver, il importe de retracer les routes d'invasion de l'espèce, ce qui signifie reconstituer l'historique d'invasion

des populations envahissantes en retraçant les voies géographiques qu'elles ont utilisées lors du processus d'invasion (Estoup et Guillemaud 2010).

### **Importance de retracer les routes d'invasion**

Retracer les routes d'invasions des EEE permet d'identifier l'origine des populations envahissantes, mais aussi leur composition génétique d'origine. Ces informations peuvent être utilisées afin de répondre autant à des questions pratiques que théoriques sur les événements d'invasions biologiques.

Une fois la source de l'invasion connue, il devient plus facile d'élaborer des stratégies pour prévenir et contrôler de futures invasions d'une même espèce (Estoup et Guillemaud 2010; Guillemaud *et al.* 2011). D'abord, connaître l'origine géographique de l'espèce exotique contribue à élaborer des mesures de surveillance et de quarantaine. Ces mesures ciblent les différentes sources d'invasion comme les vecteurs de transport ou de migration responsables de l'arrivée de l'espèce dans un nouveau territoire (Guillemaud *et al.* 2011). Cela peut permettre de limiter l'impact d'introductions récurrentes d'une espèce exotique dans un territoire où elle a déjà été introduite, mais aussi de prévenir son introduction dans de nouveaux territoires. Ensuite, retracer les routes d'invasion nous informe aussi sur l'environnement d'origine de l'espèce et le profil génétique de la population source. Connaître l'environnement biotique et abiotique de la population source permet d'élaborer des stratégies de contrôle plus efficaces et durables. Dans un contexte de lutte biologique classique, par exemple, il est suggéré de sélectionner un agent de lutte qui provient de la même région d'origine que la population de l'espèce envahissante. Ceci découle du principe qu'un agent de lutte qui a co-évolué avec la population d'origine de l'espèce envahissante possède des adaptations locales lui permettant d'être plus efficace dans le contrôle de l'espèce envahissante ciblée (Waage 1990). Par exemple, certaines populations d'hôtes présentent une résistance physiologique au parasitisme par encapsulation des œufs de parasitoïdes (Kraaijeveld *et al.* 1998). Cependant, les populations de parasitoïdes ayant co-évolué avec ces hôtes «résistants»

survivent souvent mieux à l'encapsulation, leur permettant ainsi de contrôler plus efficacement les populations de ravageurs.

De plus, d'un point de vue théorique, les invasions biologiques représentent d'excellentes opportunités pour révéler les différents processus responsables de l'évolution contemporaine des organismes (Stockwell *et al.* 2003). Pour ce faire, il est toutefois crucial de connaître la provenance des populations envahissantes afin de tester des hypothèses sur les processus évolutifs et les facteurs environnementaux impliqués dans les invasions biologiques (Keller et Taylor 2008). En effet, il peut être difficile d'identifier correctement les mécanismes causals de l'évolution lorsque l'on note un changement au niveau de la distribution d'un trait phénotypique chez une population envahissante par rapport à sa population source. Connaître la composition génétique des populations sources permet alors de bien distinguer comment les événements aléatoires, les effets fondateurs et la réponse à la sélection contribuent respectivement à expliquer la divergence phénotypique entre les populations sources et les populations envahissantes établies dans un nouveau territoire (Keller et Taylor 2008). Un exemple intéressant concerne la plante aquatique envahissante *Butomus umbellatus*, introduite en Amérique du Nord. En Europe, dans son aire d'origine, la plante forme deux groupes distincts, chacun caractérisé par des modes de reproduction différents. L'un des groupes est constitué d'individus triploïdes qui se reproduisent asexuellement par clonage et l'autre groupe présente des individus diploïdes qui se reproduisent sexuellement par graines. Dans l'aire d'origine, seulement 16% de la population est diploïde, alors que cette proportion atteint 71% dans l'aire envahie (Brown et Eckert 2005; Kliber et Eckert 2005). Un des facteurs en cause serait la sélection naturelle agissant sur l'augmentation potentielle de la variabilité génétique et de la dispersion des descendants produits sexuellement. Cependant, la génétique des populations de cette espèce a révélé que cette différence était majoritairement le résultat d'effets fondateurs plutôt que de l'adaptation évolutive (Brown et Eckert 2005; Kliber et Eckert 2005).

## Méthodes pour retracer les routes d'invasion

Traditionnellement, deux approches méthodologiques ont été utilisées afin de reconstituer les routes d'invasion des propagules : des méthodes directes qui s'appuient sur des observations actuelles et historiques des organismes sur le territoire envahi et des méthodes indirectes qui reposent sur l'analyse de données de génétique des populations.

Les méthodes directes utilisent des relevés de présence/absence des espèces envahissantes et sont conduites dans la majorité des cas par des agences nationales d'inspection au niveau des sites d'importation ou des agences de surveillance environnementale et agricole (Work *et al.* 2005). Ces relevés peuvent s'avérer très utiles lorsqu'ils sont combinés aux données bioclimatiques et écologiques des zones envahies. Par exemple, la progression mondiale d'*Aedes albopictus*, un des moustiques vecteurs de la malaria, a été reconstituée par Tatem *et al.* (2006) en joignant l'information provenant de bases de données sur le mouvement du trafic aérien et naval et le climat. Cependant, les méthodes directes ont leurs limites puisqu'elles concernent uniquement les origines géographiques immédiates des individus détectés, sans toutefois considérer, ou très rarement, les étapes subséquentes du processus d'invasion. De plus, l'information sur l'arrivée d'une espèce exotique n'est pas toujours précise, surtout chez les espèces cryptiques, de peu d'importance économique ou écologique ou n'ayant pas été détecté par les autorités mentionnées précédemment. Ces limites sont toutefois moins problématiques lorsque l'espèce envahissante est facilement détectable (e.g., très colorée, très active, etc.) et concentrée dans des régions densément peuplées. À ce moment, les mentions organisées en série temporelle peuvent suggérer une voie de dispersion dans la zone envahie.

Les méthodes indirectes de reconstitution des routes d'invasion se basent sur les patrons spatiaux de variation génétique au niveau inter- et intra-populationnel dans l'aire native et envahie (voir Estoup et Guillemaud 2010). La variation génétique s'observe à trois différents niveaux : au sein d'une population, entre les populations et entre les espèces. Les méthodes indirectes décrites ci-dessous concernent uniquement les variations génétiques au

sein et entre populations. Les espèces sont rarement, voire jamais, constituées d'un seul groupe de reproduction où tous les individus ont autant de chance de se produire entre eux. Elles se divisent plutôt en populations, soit des groupes panmictiques d'individus qui s'échangent des allèles entre eux plus fréquemment qu'avec des individus extérieurs au groupe. Le taux d'échange de gènes entre les populations peut être restreint par une structure spatiale qui limite le contact entre les individus de différentes populations, par une capacité de dispersion limitée des individus présents sur un vaste territoire ou par des mécanismes d'isolement sexuel. Ces différentes populations vont alors être soumises à des forces évolutives différentes (e.g., mutation, migration, dérive, sélection). Ces forces évolutives vont d'une part entraîner des changements au niveau de la composition génétique d'une population, et d'autre part accentuer la différenciation génétique entre les différentes populations. Ainsi, chacune des populations acquiert une signature génétique qui lui est propre. Cette signature génétique permet alors de différencier les populations en fonction de leur composition en allèles et de leurs génotypes, tel qu'établi à un ou plusieurs marqueurs génétiques.

Les méthodes de regroupement génétique, comme celles exécutées par les logiciels STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000), BAPS (Corander *et al.* 2003), ou GENELAND (Guillot *et al.* 2005), sont fréquemment utilisées dans les études sur l'origine des populations envahissantes (Rollins *et al.* 2009; Boissin *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2014). Ces trois logiciels ont la particularité d'assigner des individus à des populations dites « virtuelles ». Pour ce faire, ils tentent de définir le nombre de « sous-populations » présentes au sein de l'ensemble des échantillons utilisés et par la suite de partager les individus parmi ces groupes reconstruits virtuellement (Excoffier et Heckel 2006). Les logiciels BAPS et GENELAND commencent par déterminer le nombre optimal de populations « virtuelles » (ou groupes génétiques) pour ensuite y assigner les individus, alors que STRUCTURE génère ces assignations de façon séquentielle pour différents nombres de groupes génétiques, et ensuite spécifie le nombre de groupe étant le plus probable selon le modèle utilisé (Excoffier et Heckel 2006). Les groupes génétiques générés par ce type d'analyse peuvent permettre de déduire certains scénarios d'introduction. Par exemple, si une population envahissante se regroupe fortement avec l'une des populations sources potentielles, on considère qu'il y a une forte probabilité que l'origine de la population envahissante soit identifiée (Darling *et al.* 2008; Rollins *et al.* 2009). On peut

aussi supposer que plusieurs populations se soient hybridées lors de leur établissement sur le territoire envahi si la population envahissante se regroupe dans plus d'une population source potentielle (Darling *et al.* 2008; Rosenthal *et al.* 2008). De plus, les méthodes de regroupement génétique permettent d'évaluer si le processus d'invasion fût caractérisé par plusieurs introductions indépendantes provenant de différentes populations (sans hybridation) (Alda *et al.* 2013; Shirk *et al.* 2014). La construction de dendrogrammes (e.g., "neighbour-joining trees") (Thibault *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2014) ou l'analyse en coordonnées principales (ACoP) (Zhang *et al.* 2010; Shirk *et al.* 2014), toutes deux réalisées à partir de matrice de distance génétique entre les différents groupes, sont très utilisées pour évaluer la structure génétique d'espèces envahissantes. Comparativement aux méthodes de regroupement génétique décrites dans les logiciels mentionnés précédemment, celle-ci nous informe sur le niveau de similarité entre les différents groupes analysés, ce qui permet de mieux visualiser les patrons de relation génétique entre ceux-ci. L'allocation populationnelle, produite à partir de calculs de probabilité d'affectation, est aussi une méthode utile pour identifier la source des populations envahissantes (Pascual *et al.* 2007; Ciosi *et al.* 2008; Tepolt *et al.* 2009). Pascual *et al.* (2007) ont démontré que cette méthode demeure efficace même si les populations sources potentielles présentent peu de différenciation génétique entre elles et si la population envahissante a subi des effets fondateurs importants.

Les méthodes indirectes sont toutefois sujettes à une limite importante : elles considèrent très peu l'aspect stochastique de l'histoire démographique et génétique des populations considérées. En effet, plusieurs événements, comme (i) la dérive génétique, (ii) l'effet fondateur, (iii) le goulot d'étranglement, (iv) les événements de mutation et (v) l'échantillonnage limité de populations sources potentielles, influencent de façon aléatoire la composition génétique des échantillons étudiés (Estoup et Guillemaud 2010). Ainsi, négliger le niveau de stochasticité potentiellement élevé de ces événements peut limiter la validité des résultats obtenus par ces méthodes indirectes. Cependant, malgré cette contrainte, les modèles indirects s'avèrent très utiles, surtout lorsque les populations sources putatives présentent des différences génétiques substantielles (Geller *et al.* 2010). L'inférence des routes d'invasion du reptile *Anolis sagrei* en Floride (Kolbe *et al.* 2004) illustre le succès des modèles indirects puisque l'importante différenciation génétique inter-populationnelle et la faible diversité



génétique intra-populationnelle au niveau du territoire d'origine ont permis de distinguer les multiples introductions qui ont eu lieu en Floride.

Finalement, afin de reconstituer les routes d'invasion d'un organisme envahissant, tel que décrit ci-haut, il faut être en mesure de connaître le nombre de populations différentes s'étant établies sur le nouveau territoire, d'identifier l'origine géographique de ces populations et de comprendre comment ces populations ont par la suite progressé sur le territoire envahi. Répondre à toutes ces questions implique d'utiliser les deux types de méthodes, de réaliser différentes analyses statistiques et d'intégrer l'ensemble des informations générées par ces différentes méthodes et analyses.

### **Biologie du criocère du lis**

Le criocère du lis, *Lilioceris lili*, mesure entre 6 à 8 mm et possède de petits yeux proéminents, un pronotum étranglé à l'arrière de la section médiane et de larges élytres. Le pronotum, plus étroit que les élytres, et les élytres sont d'un rouge écarlate, alors que la tête, l'abdomen, les antennes et les pattes sont de couleur noire (Labeyrie 1963; Ernst 2005) (Fig. 1.1).



**Fig. 1.1** Cricocère du lis (*Lilioceris lili*) adulte  
Crédit de photo : Masim Eduardovich Smirnov, Russie

Les adultes hivernent au sol sous la litière végétale et émergent tôt au printemps. Ils se nourrissent alors des jeunes feuilles de leurs plantes hôtes puis s'accouplent (Ernst 2005). Les femelles pondent par la suite leurs œufs sur la surface antérieure des jeunes feuilles, en formant des successions irrégulières de 3 à 12 œufs. Une dizaine de jours plus tard, les œufs commencent à éclore et les larves s'alimentent ensuite voracement des feuilles de la plante hôte (Ernst 2005) pendant une période de 10 à 24 jours afin de compléter quatre stades larvaires. Les larves pré-nymphales s'enfoncent ensuite dans le sol afin d'initier la nymphose à l'intérieur d'un cocon de soie, laquelle dure une vingtaine de jours. Après quoi les adultes de la nouvelle génération émergent du sol et s'alimentent quelques semaines avant de retourner au sol pour la diapause hivernale (Haye et Kenis 2004; Ernst 2005), faisant ainsi de *L. lili* une espèce strictement univoltine.

Plusieurs études ont examiné la gamme d'hôtes de *L. lili*. L'espèce peut compléter son développement uniquement sur les plantes des genres *Lilium*, *Fritillaria* et *Cardiocrinum* (Salisbury 2008), avec comme seule exception une seule larve (parmi 45) ayant survécu sur *Streptopus amplexifolius* Linné (Ernst *et al.* 2007). Parmi ces trois genres, le cricocère du lis a

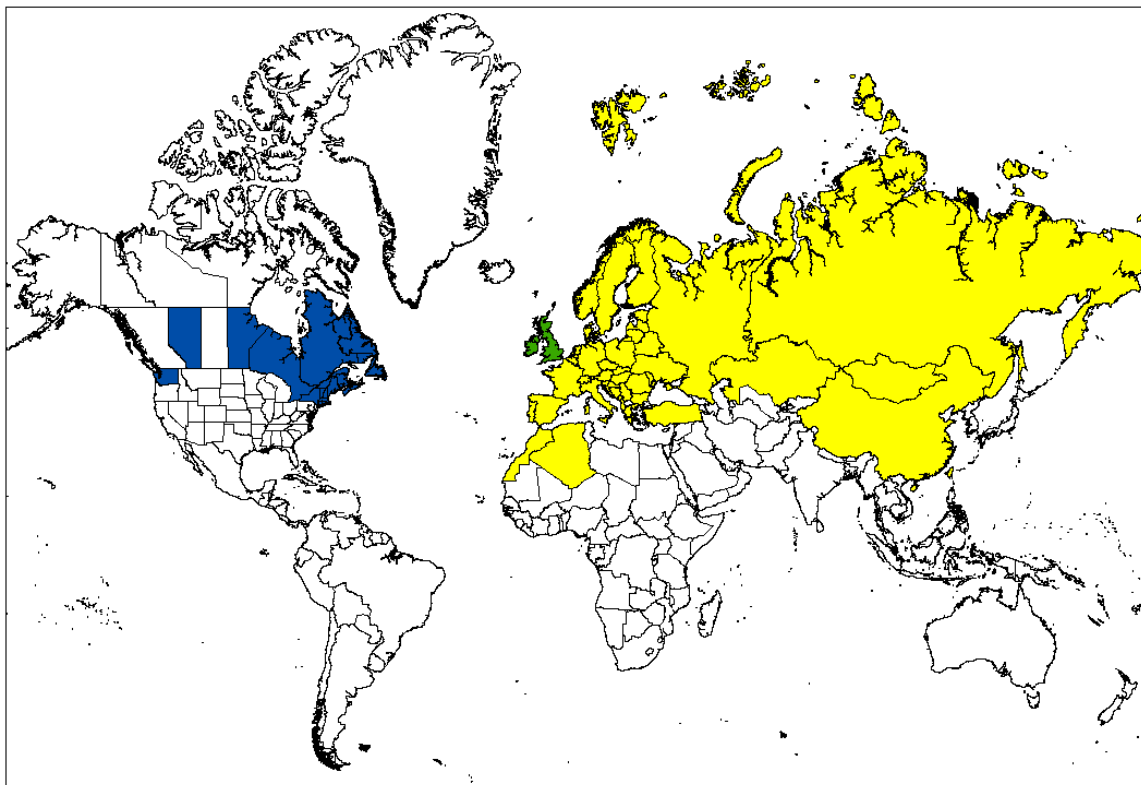
été observé jusqu'à maintenant sur 57 espèces de *Lilium* hybrides, 30 espèces de *Lilium*, 5 espèces de *Fritillaria* et 1 espèce de *Cardiocrinum* (Salisbury 2008). Ces informations proviennent majoritairement d'observations ponctuelles réalisées au Royaume-Uni (Salisbury 2008). Les différentes espèces ou cultivars de plantes hôtes ne sont pas tous aussi sévèrement affectés par ce défoliateur (Livingston 1996; Casagrande et Tewksbury 2007), ce qui suggère une résistance différentielle chez certaines espèces d'hôtes.

Aucun ennemi naturel du criocère du lis n'a été trouvé en Amérique du Nord (Casagrande et Kenis 2004). En Europe, plusieurs parasitoïdes d'œufs et de larves ont été identifiés, dont trois espèces observées en grand nombre dans plusieurs régions européennes (Haye et Kenis 2004). *Tetrastichus setifer* Thomson (Hymenoptera: Eulophidae) est le parasitoïde le plus largement réparti en Europe, mais *Diaparsis jucunda* Holmgren (Hymenoptera: Ichneumonidae) s'avère le parasitoïde dominant du centre et du sud de l'Europe. Cependant, *Lemophagus errabundus* Gravenhorst (Hymenoptera: Ichneumonidae) est le parasitoïde le plus dominant dans l'ouest et le nord de l'Europe, alors qu'il est rare, voire absent, dans les autres régions européennes (Casagrande et Kenis 2004).

Aux États-Unis, entre 1999 et 2004, *T. setifer* a été relâché au Massachusetts, Rhode Island, Maine et New Hampshire et s'y est établi avec succès (Tewksbury *et al.* 2005). Par la suite, *L. errabundus* et *D. jucunda* ont aussi été relâchés dans ces états et ont réussi à s'y établir. Au Canada, *T. setifer* a été relâché pour la première fois en 2010 à la Ferme Centrale Expérimentale d'Ottawa, Ontario (Cappuccino *et al.* 2013). L'année suivante, des larves de *L. lili* ont été récoltées dans la zone de relâche et élevées en laboratoire jusqu'au stade de nymphe. La dissection des nymphes a permis de confirmer la présence de *T. setifer* dans les larves de *L. lili*, indiquant que ce dernier a hiverné avec succès. Toutefois, il est trop tôt pour confirmer l'établissement du parasitoïde au Canada, ou pour déterminer son impact sur les populations de *L. lili* (Cappuccino *et al.* 2013).

## **Distribution mondiale du criocère du lis**

Initialement, le criocère du lis avait une distribution paléarctique; plus précisément du Portugal (Audisio 2011) au nord-est de la Chine (Yu *et al.* 2001) et de la Sibérie (Berti et Rapilly 1976) au nord de l'Afrique (Labeyrie 1963; Berti et Rapilly 1976). Cet insecte se retrouve maintenant sur tous les continents de l'hémisphère nord où les *Lilium* (cultivés ou sauvages) peuvent croître (Audisio 2011), faisant de *L. lili* l'espèce du genre *Lilioceris* ayant la plus vaste aire de répartition mondiale (Nolte 1939; Berti et Rapilly 1976; Cox 2001; Gold 2003) (Fig. 1.2). *Lilioceris lili* était, jusqu'à tout récemment, la seule espèce du genre *Lilioceris* en Amérique du Nord (Berti et Rapilly 1976; Gold *et al.* 2001). Depuis 2012, *Lilioceris cheni* a été introduit comme agent de lutte biologique en Floride pour lutter contre *Dioscorea bulbifera*, une vigne asiatique envahissante dans le sud-est des États-Unis (Center *et al.* 2013).



**Fig. 1.2** Distribution mondiale de *L. lili*. Les superficies en jaune représentent l'aire native ou naturalisée; celles en vert l'aire envahie en Eurasie et celles en bleu l'aire envahie en

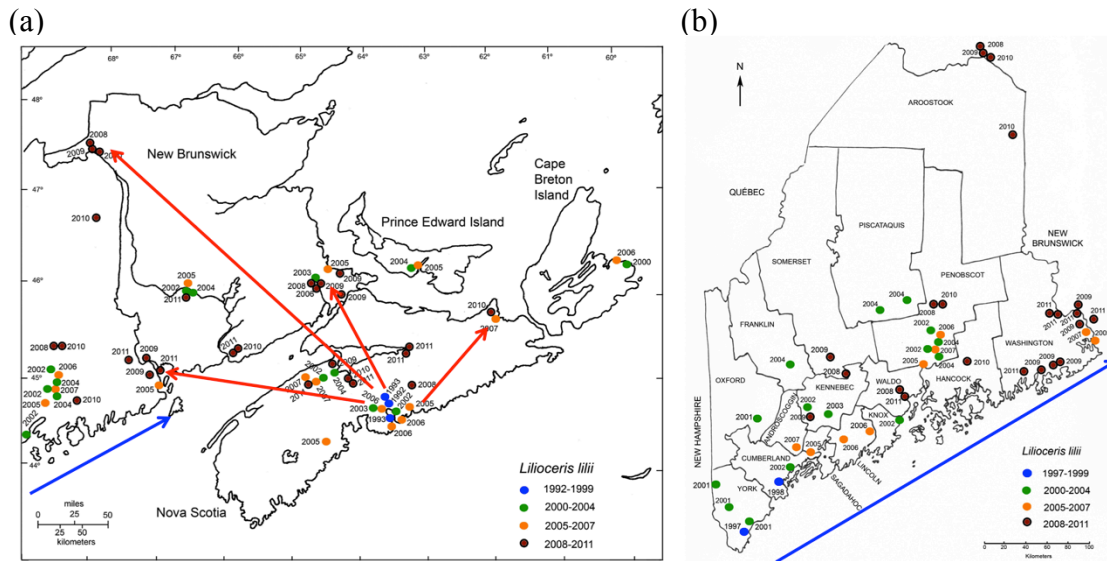
Amérique du Nord. L'information provient de l'*Invasive Species Compendium* (ISC) (CABI 2014) et des données récoltées durant la réalisation de ce projet.

Il n'y a pas de doute quant au statut d'espèce exotique du criocère du lis en Amérique du Nord (Brown 1946; Berti et Rapilly 1976) et au Royaume-Uni (Fox Wilson 1942; Cox 2001; Anderson et Bell 2002), mais tel n'est pas le cas pour certaines régions européennes. Par exemple, le criocère du lis est considéré comme indigène aux Pays-Bas et en Suède bien que ses plantes hôtes n'y soient pas natives (Rämert *et al.* 2009). L'origine précise de l'espèce demeure débattue à ce jour. Certains auteurs supposent que l'espèce provient de la Chine (Berti et Rapilly 1976; Ernst 2005), mais peu d'archives en Chine corroborent cette hypothèse (Lu et Casagrande 1998; Yu *et al.* 2001). Tout récemment, Orlova-Bienkowskaja (2013) a analysé la dynamique de distribution de l'espèce depuis les 250 dernières années, et a conclu que la distribution de *L. lili* en Europe serait secondaire, donc envahissante. Cette invasion ne serait toutefois pas récente, car l'espèce était déjà présente dans l'ouest de l'Europe en 1688 (Warchalowski 1985) et aurait probablement été introduite au cours de la fin du 16<sup>e</sup> et début du 17<sup>e</sup> siècle. Ainsi, *L. lili* aurait le statut d'une espèce envahissante naturalisée en Europe (Orlova-Bienkowskaja 2013). Aucune étude n'a analysé la structure génétique des différentes populations de l'espèce à travers l'Europe et l'Asie.

Le criocère du lis fut signalé pour la première fois en Amérique du Nord en 1945 (Brown 1946) sur l'île de Montréal, mais un spécimen récolté en 1943 à Sainte-Anne-de-Bellevue fut trouvé dans le matériel entomologique de l'Université de Montréal par LeSage (1983). Jusqu'à récemment, il était admis que l'espèce est demeurée confinée à l'île de Montréal durant une quarantaine d'années, après qu'un spécimen ait été récolté en 1978 sur la rive nord du fleuve Saint-Laurent dans la région de Saint-Hyppolite, Québec (LeSage 1983). Cependant, avec l'aide d'information en provenance d'entomologistes amateurs, nous croyons que *L. lili* fut observé pour la première fois à l'extérieur de l'île de Montréal en 1969 à Saint-Lambert, Québec (P. de Tonnancour, communication personnelle), devançant ainsi la date d'expansion hors de Montréal d'une dizaine d'années. Le criocère du lis a ensuite été observé à Ottawa en 1981, soit à une distance de près de 200 km par rapport à Montréal. En 1992, deux nouvelles populations ont été signalées : une à Halifax, Nouvelle-Écosse, à un peu moins

de 800 km de Montréal, et l'autre à Cambridge, Massachusetts, États-Unis, à environ 400 km de Montréal (Day 1993).

Dans les provinces maritimes canadiennes, *L. lili* a été confiné à la région métropolitaine d'Halifax entre 1992 et 2001 (Majka et LeSage 2008). Par la suite, cette population semble avoir servi de foyer d'invasion (Fig. 1.3a) pour les régions environnantes telles que Fredericton (2002), Moncton (2003), la Vallée d'Annapolis (2004), Cornwall (2004), Bridgewater (2005), Antigonish (2007), Edmundston (2008), St. Stephen (2009), Baie de Fundy (2010) et Truro (2011) (Majka et LeSage 2008; Majka et Kirby 2011). Tout récemment, la présence de *L. lili* fut confirmée pour la première fois dans la province de Terre-Neuve à Grand Falls-Windsor durant l'été 2013 (Hicks et Sellars 2014). Cette observation est la mention la plus récente de *L. lili* sur un nouveau territoire de l'est du Canada. Le criocère du lis a aussi progressé vers l'ouest du Canada. Il a été observé pour la première fois à Toronto en 1993 (Gooderham 1993), puis ensuite en 1999 à Portage-la-Prairie, Manitoba, à environ 90 km à l'ouest de Winnipeg (LeSage et Elliott 2003). La distance entre Toronto et Portage-la-Prairie représente une progression de presque 2 000 km en six ans. Selon LeSage et Elliott (2003), cette distance est beaucoup trop grande et le temps écoulé entre les deux observations beaucoup trop court pour que l'insecte se soit dispersé par lui-même. Il a aussi observé dans la région de Airdie, Alberta en 2007 (Westfall 2009).



**Fig. 1.3** Distribution de *L. lili* dans les provinces maritimes du Canada (a) et dans l'état du Maine (b) (Majka et Kirby 2011). Les points représentent les dates de première mention de *L. lili* à une localité donnée. Les flèches rouges représentent le flux probable de propagation de *L. lili*, selon les dates de premières mentions, sur le territoire à partir d'Halifax. Les flèches bleues représentent le flux probable de propagation de *L. lili* sur le territoire à partir du sud du Maine, États-Unis.

Aux États-Unis, après une première mention dans l'état du Massachusetts en 1992 (Day 1993), *L. lili* a été observé successivement au New Hampshire (1997), au Vermont (1998), au Maine (1999), au Rhode Island (1999), à New York (2000) et au Connecticut (2001) (Gold 2003). Dans l'état du Maine, un suivi rigoureux de la progression de l'insecte sur le territoire a été réalisé. Selon les données publiées par Majka et Kirby (2011), il semblerait qu'un front d'invasion du criocère du lis remonte la côte-est américaine vers le Nord (Fig. 1.3b). De plus, *L. lili* a été observé récemment à Bellevue, état de Washington, durant le printemps 2012 (Murray *et al.* 2012). Cette observation est la mention la plus récente du criocère du lis aux É-U. Le criocère du lis est donc, à ce jour, présent dans toutes les provinces canadiennes à l'exception de la Colombie-Britannique et de la Saskatchewan (LeSage 1983; LeSage et Elliott 2003; Majka et LeSage 2008) et dans tous les états américains de la Nouvelle-Angleterre, en plus de l'état de New York (Livingston 1996; Gold 2003; Maier 2005; Majka et LeSage 2008) et du New Jersey (Cappuccino *et al.* 2013) sur la côte est américaine et de Washington au niveau de la côte ouest américaine.

De plus, le criocère du lis, dont les observations se limitaient uniquement aux lis ornementaux, a été récemment observé sur le lis du Canada, *Lilium canadense*, à l'état sauvage en Amérique du Nord (Bouchard *et al.* 2008; Majka et LeSage 2008). Puisque le criocère du lis n'a pas d'ennemi naturel ici en Amérique du Nord, il représente désormais une importante menace pour les populations de lis sauvages (Bouchard *et al.* 2008), d'autant plus que plusieurs autres facteurs contribuent déjà à la raréfaction du lis du Canada en Amérique du Nord comme le broutage par le cerf de Virginie, la coupe forestière, la destruction d'habitat et le prélèvement de bulbes ou de spécimens entiers à des fins horticoles (Gilbert 2005).

En somme, bien que l'insecte se soit établi en Amérique du Nord au milieu du XX<sup>e</sup> siècle, son expansion géographique sur le territoire nord-américain a débuté il y a moins de 30 ans. Cette progression tardive sur le territoire américain soulève plusieurs questions. Nous ignorons pourquoi un insecte ailé a été confiné sur l'île de Montréal durant toutes ces années, pour ensuite progresser d'environ 3 000 km en moins de 30 ans. De plus, nous ignorons si cette progression provient d'un seul lieu d'introduction (Montréal) ou si d'autres introductions subséquentes, à différents endroits sur le continent, ont permis au criocère du lis de progresser aussi rapidement sur le territoire nord-américain. Il est donc impératif de déterminer les routes d'invasion du criocère du lis en Amérique du Nord afin d'obtenir des réponses à ces questions.

## **Objectifs de l'étude**

Le but principal de cette étude est de retracer les routes d'invasion de *L. lili* en Amérique du Nord. Le projet a été élaboré en trois objectifs. Le premier objectif explore la structure génétique des individus nord-américains afin de déterminer s'il existe une seule source d'invasion ou si plusieurs introductions de criocère lis se sont produites en provenance de différentes sources. Le deuxième objectif vise à localiser l'origine géographique de la source (ou des sources) d'invasion en étudiant la structure génétique de *L. lili* en Europe et en Amérique du Nord, et en réalisant des analyses d'assignation populationnelle.



Finalement, le troisième objectif regroupe les informations sur les dates de première mention de *L. lili* en Amérique du Nord et les informations obtenues sur la structure génétique de l'espèce pour proposer un scénario de progression sur le continent nord-américain.

## Références

- Alda F, Ruiz-López MJ, García FJ, *et al.* (2013) Genetic evidence for multiple introduction events of raccoons (*Procyon lotor*) in Spain. *Biological Invasions* 15:687-698
- Anderson R, Bell AC (2002) First record of the Lily Beetle *Lilioceris lili* (Scopoli) in Ireland (Chrysomelidae: Criocerinae). *The Coleopterist* 11:90
- Audisio P (2011) Fauna Europaea : *Lilioceris lili*. In: Fauna Europaea version 2.4. [http://www.faunaeur.org/full\\_results.php?id=243537](http://www.faunaeur.org/full_results.php?id=243537), Accessed: 11/05/2012
- Berti N, Rapilly M (1976) Liste d'espèces et révision du genre *Lilioceris* Reitter (Col. Chrysomelidae). In Faune d'Iran. *Annales de la Société Entomologique de France* (Nouvelle série), France, pp. 31-73
- Boissin E, Hurley B, Wingfield M, *et al.* (2012) Retracing the routes of introduction of invasive species: the case of the *Sirex noctilio* woodwasp. *Molecular Ecology* 21:5728-5744
- Bouchard AM, McNeil JN, Brodeur J (2008) Invasion of American native lily populations by an alien beetle. *Biological Invasions* 10:1365-1372
- Brown JS, Eckert CG (2005) Evolutionary increase in sexual and clonal reproductive capacity during biological invasion in an aquatic plant *Butomus umbellatus* (Butomaceae). *American Journal of Botany* 92:495-502
- Brown WJ (1946) Some new Chrysomelidae, with notes on other species (Coleoptera). *The Canadian Entomologist* 78:47-54
- CABI (2014) Invasive Species Compendium. In: CAB International. <http://www.cabi.org/isc>, Accessed: 2014
- Cappuccino N, Haye T, Tewksbury LA, *et al.* (2013) *Lilioceris lili* (Scopoli), Lily Leaf Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). eds: Mason PG and Gillespie DR, In *Biological control programmes in Canada 2001-2012*. CABI Publishing, Oxfordshire, UK,
- Casagrande RA, Kenis M (2004) Evaluation of lily leaf beetle parasitoids for North American introduction. eds: Van Driesche RG and Reardon R, In *Assessing host ranges of*

- parasitoids and predators used for classical biological control: a guide to best practice. USDA Forest Service Publication FHTET-2004-03. USDA, Morgantown, WV, USA, pp. 121-137
- Casagrande RA, Tewksbury LA (2007) Lily leaf beetle biological control. Research Report to the North American Lily Society, University of Rhode Island, RI, USA
- Center TD, Rayamajhi M, Dray FA, *et al.* (2013) Host range validation, molecular identification and release and establishment of a Chinese biotype of the Asian leaf beetle *Lilioceris cheni* (Coleoptera: Chrysomelidae: Criocerinae) for control of *Dioscorea bulbifera* L. in the southern United States. *Biocontrol Science and Technology* 23:735-755
- Ciosi M, Miller N, Kim K, *et al.* (2008) Invasion of Europe by the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*: multiple transatlantic introductions with various reductions of genetic diversity. *Molecular Ecology* 17:3614-3627
- Corander J, Waldmann P, Sillanpää MJ (2003) Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics* 163:367-374
- Cox ML (2001) The status of the lily beetle *Lilioceris lili* (Scopoli, 1763) in Britain (Chrysomelidae: Criocerinae). *The Coleopterist* 10:5-20
- Darling JA, Bagley MJ, Roman J, *et al.* (2008) Genetic patterns across multiple introductions of the globally invasive crab genus *Carcinus*. *Molecular Ecology* 17:4992-5007
- Day R (1993) *Lilioceris lili*. A report to E.O. Stockbridge, OIC, APHIS, 10 Causeway St., Boston, MA, USA
- di Castri F (1989) History of biological invasions with emphasis on the Old World. eds: Drake JA, Mooney HA, di Castri F, Groves RH, Kruger FJ, Rejmanek M and Williamson M, In *Biological invasions: a global perspective*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 1-30
- Donovan GH, Butry DT, Michael YL, Prestemon JP, Liebhold AM, Gatzliolis D, Mao MY (2013) The relationship between trees and human health: Evidence from the spread of the emerald ash borer. *Am J Prev Med* 44:139-145
- Elton CS (1958) *The Ecology of Invasions by Animals and Plants*. Methuen, London, UK
- Environnement Canada (2012) Programme de partenariat sur les espèces exotiques envahissantes: Rapport 2005-2010. Canada
- Ernst C (2005) The Lily Leaf Beetle (*Lilioceris lili*): an unwelcome invader. *Lily Yearbook of the North American Lily Society* 58:29-34

- Ernst C, Cappuccino N, Arnason JT (2007) Potential novel hosts for the lily leaf beetle *Lilioceris lili* Scopoli (Coleoptera: Chrysomelidae) in eastern North America. *Ecological Entomology* 32:45-52
- Estoup A, Guillemaud T (2010) Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what? *Molecular Ecology* 19:4113-4130
- Excoffier L, Heckel G (2006) Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. *Nature Reviews Genetics* 7:745-758
- Fox Wilson G (1942) The lily beetle, *Crioceris lili*. *Journal of the Royal Horticultural Society* 67:165-168
- Geller JB, Darling JA, Carlton JT (2010) Genetic perspectives on marine biological invasions. *Annual Review of Marine Science* 2:367-393
- Gilbert H (2005) Espèces menacées ou vulnérables, Développement durable, Environnement et Parcs Québec. In. <http://www.mddep.gouv.qc.ca/biodiversite/especes/lis/index.htm>, Accessed: 20/10/2012
- Gold MS (2003) Biological control of the lily leaf beetle, *Lilioceris lili*, in North America. ProQuest Dissertations and Theses:n/d
- Gold MS, Casagrande RA, Tewksbury LA, *et al.* (2001) European parasitoids of *Lilioceris lili* (Coleoptera: Chrysomelidae). *The Canadian Entomologist* 133:671-674
- Gooderham M (1993) Canada fights invasion of the lily snatchers. *The Globe and Mail*. Canadian Periodicals Index Quarterly, Toronto, Canada, pp. A6
- Guillemaud T, Ciosi M, Lombaert É, *et al.* (2011) Biological invasions in agricultural settings: Insights from evolutionary biology and population genetics. *Comptes Rendus de Biologies* 334:237-246
- Guillot G, Mortier F, Estoup A (2005) GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes* 5:712-715
- Haye T, Kenis M (2004) Biology of *Lilioceris* spp. (Coleoptera: Chrysomelidae) and their parasitoids in Europe. *Biological Control* 29:399-408
- Hicks B, Sellars R (2014) Record of the lily leaf beetle *Lilioceris lili* (Coleoptera: Chrysomelidae) in Newfoundland. *Journal of the Acadian Entomological Society* 7:70-74
- Keller SR, Taylor DR (2008) History, chance and adaptation during biological invasion: separating stochastic phenotypic evolution from response to selection. *Ecology Letters* 11:852-866

- Kliber A, Eckert CG (2005) Interaction between founder effect and selection during biological invasion in an aquatic plant *Evolution* 59:1900-1913
- Kolbe JJ, Glor RE, Schettino LR, *et al.* (2004) Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. *Nature* 431:177-181
- Kraaijeveld AR, Van Alphen JJM, Godfray HCJ (1998) The coevolution of host resistance and parasitoid virulence. *Parasitology* 116:S29-S45
- Labeyrie V (1963) *Lilioceris*. ed Balachowsky AS, In *Entomologie Appliquée à l'Agriculture*, Tome 1. Masson & Cie, Paris, France, pp. 588-595
- LeSage L (1983) Note sur la distribution présente et future du criocère du lys, *Lilioceris lili* Scopoli (Coleoptera: Chrysomelidae), dans l'est du Canada. *Le Naturaliste Canadien* 110:95-97
- LeSage L, Elliott B (2003) Major range extension of the lily leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae), a pest of wild and cultivated Liliaceae. *The Canadian Entomologist* 135:587-588
- Livingston SB (1996) Biological Control and Host Range of *Lilioceris lili*: A New Ornamental Pest in the USA. MS thesis, University of Rhode Island.
- Lu W, Casagrande RA (1998) Notes on distribution and host range of *Lilioceris* in China (Coleoptera: Chrysomelidae). *Chrysomela* 35:7-8
- Mack RN, Simberloff D, Lonsdale MW, *et al.* (2000) Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecological Applications* 10:689-710
- Maier CT (2005) First records of alien insects in Connecticut (Orthoptera : Tettigoniidae; Coleoptera : Buprestidae, Chrysomelidae; Diptera : Rhagionidae, Tephritidae; Hymenoptera : Megachilidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 107:947-959
- Majka CG, Kirby C (2011) Lily leaf beetle, *Lilioceris lili* (Coleoptera: Chrysomelidae), in Maine and the Maritime Provinces: the continuing dispersal of an invasive species. *Journal of the Acadian Entomological Society* 7:70-74
- Majka CG, LeSage L (2008) Introduced leaf beetles of the maritime provinces, 5: The lily leaf beetle, *Lilioceris Lili* (Scopoli) (Coleoptera : Chrysomelidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 110:186-195
- Murray T, LaGasa E, Glass J (2012) Pest Alert: Red Lily Leaf Beetle. In: Home Gardening. <http://oregonstate.edu/dept/nurspest/RLLB.pdf>, Accessed: 11/03/2011
- Nolte HB (1939) Zur biologie des lilienhähnchens. *Die Kranke Pflanze* 16:7-10

- Orlova-Bienkowskaja MJ (2013) Dynamics of the range of lily leaf beetle (*Lilioceris lili*, Chrysomelidae, Coleoptera) indicates its invasion from Asia to Europe in the 16th–17th century. *Russian Journal of Biological Invasions* 4:93-104
- Pascual M, Chapuis M, Mestres F, *et al.* (2007) Introduction history of *Drosophila subobscura* in the New World: a microsatellite-based survey using ABC methods. *Molecular Ecology* 16:3069-3083
- Pejchar L, Mooney HA (2009) Invasive species, ecosystem services and human well-being. *Trends in Ecology & Evolution* 24:497-504
- Pimentel D (2002) *Biological Invasions: Economic and Environmental Costs of Alien Plant, Animal, and Microbe Species*. CRC PressINC, Boca Raton, FL, USA
- Pimentel D, McNair S, Janecka J, *et al.* (2001) Economic and environmental threats of alien plant, animal, and microbe invasions. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 84:1-20
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959
- Rämert B, Kenis M, Kroon H, *et al.* (2009) Larval parasitoids of *Lilioceris lili* (Coleoptera: Chrysomelidae) in Sweden and potential for biological control. *Biocontrol Science and Technology* 19:335-339
- Rollins LA, Woolnough AP, Wilton AN, *et al.* (2009) Invasive species can't cover their tracks: using microsatellites to assist management of starling (*Sturnus vulgaris*) populations in Western Australia. *Molecular Ecology* 18:1560-1573
- Rosenthal DM, Ramakrishnan AP, Cruzan MB (2008) Evidence for multiple sources of invasion and intraspecific hybridization in *Brachypodium sylvaticum* (Hudson) Beauv. in North America. *Molecular Ecology* 17:4657-4669
- Salisbury A (2008) Impact, host range and chemical ecology of the lily beetle, *Lilioceris lili*. Ph.D. thesis, Imperial College London.
- Shirk R, Hamrick J, Zhang C, *et al.* (2014) Patterns of genetic diversity reveal multiple introductions and recurrent founder effects during range expansion in invasive populations of *Geranium carolinianum* (Geraniaceae). *Heredity* 112:497-507
- Stockwell CA, Hendry AP, Kinnison MT (2003) Contemporary evolution meets conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution* 18:94-101
- Tatem AJ, Hay SI, Rogers DJ (2006) Global traffic and disease vector dispersal. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:6242-6247
- Tepolt C, Darling J, Bagley M, *et al.* (2009) European green crabs (*Carcinus maenas*) in the northeastern Pacific: genetic evidence for high population connectivity and current-

mediated expansion from a single introduced source population. *Diversity and Distributions* 15:997-1009

- Tewksbury L, Gold MS, Casagrande RA, *et al.* (2005) Establishment in North America of *Tetrastichus setifer* Thomson (Hymenoptera: Eulophidae), a parasitoid of *Lilioceris lili* (Coleoptera; Chrysomelidae), pp. 142-143. In Hoddle M (ed), Proceedings of the Second International Symposium of Biological Control of Arthropods, September 12–16, 2005, Davos, Switzerland. USDA Forest Service Publication FHTET-2005-08. Morgantown, WV, USA
- Thibault I, Bernatchez L, Dodson JJ (2009) The contribution of newly established populations to the dynamics of range expansion in a one-dimensional fluvial-estuarine system: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Eastern Quebec. *Diversity and Distributions* 15:1060-1072
- Waage J (1990) Ecological theory and the selection of biological control agents. eds: Mackauer M, Ehler IE and Roland J, In *Critical issues in biological control*. Intercept, Andover, UK, pp. 135-157
- Warchalowski A (1985) Chrysomelidae. *Stonkowate* (Insecta: Coleoptera). *Fauna Polski* 10
- Wells MJ, Poynton RJ, Balsinhas AA, *et al.* (1986) The history of introduction of invasive alien plants to southern Africa. eds: Macdonald IAW, Kruger FJ and Ferrar AA, In *The ecology and management of biological invasions in Southern Africa*. Oxford University Press, Cape Town, South Africa, pp. 21-35
- Westfall L (2009) Red Menace Alert for Calgary Area! In: *Gardens West*. [http://www.gardenswest.com/qry/page.taf?id=30&\\_function=atcldetail&sbstatcl\\_uid1=2129](http://www.gardenswest.com/qry/page.taf?id=30&_function=atcldetail&sbstatcl_uid1=2129), Accessed: 16/05/2012
- Work TT, McCullough DG, Cavey JF, *et al.* (2005) Arrival rate of nonindigenous insect species into the United States through foreign trade. *Biological Invasions* 7:323-332
- Yu P, Lu W, Casagrande RA (2001) *Lilioceris lili* (Scopoli) occurs in China (Coleoptera: Chrysomelidae). *The Coleopterists Bulletin* 55:65-66
- Zhang B, Edwards O, Kang L, *et al.* (2014) A multi-genome analysis approach enables tracking of the invasion of a single Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia*) clone throughout the New World. *Molecular Ecology* 23:1940-1951
- Zhang YY, Zhang DY, Barrett SC (2010) Genetic uniformity characterizes the invasive spread of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*), a clonal aquatic plant. *Molecular Ecology* 19:1774-1786

## 2. ROUTES OF INVASION OF THE LILY LEAF BEETLE, *LILIOCERIS LILII* (SCOPOLI), IN NORTH AMERICA

Alessandro Dieni<sup>a</sup>, Julie Turgeon<sup>b</sup> and Jacques Brodeur<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institut de Recherche en Biologie Végétale, Département de sciences biologiques, Université de Montréal, Montréal (Québec), Canada

<sup>b</sup>Département de Biologie, Université Laval, Québec (Québec), Canada

### Abstract

Identifying routes of invasions of exotic organisms is an essential step to prevent further introductions and to manage established populations. The invasion of North America by the lily leaf beetle (*Lilioceris lili*) is well documented, but the source(s) of the introduced population(s) and the geographical pathway(s) followed by the beetle during its progression in North America remain unknown. We used Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) to characterize the genotype of 516 individuals across 25 locations in North America and 9 locations in Europe. Genetic clustering analyses and principal coordinate analyses (PCoA) revealed clear genetic differences between individuals from Canada and the USA, suggesting two different episodes of introduction in North America, a first one in Montréal, Québec, Canada, in 1943 and a second one in Cambridge, Massachusetts, United States of America, in 1992. Population allocation analyses further suggested that the invasive populations of *L. lili* originated from northern Europe, more precisely in southern United Kingdom and the western part of Germany. Finally, dates of first mentions of the beetle across North America, paired with the genetic diversity of the beetles at each location, showed that there are two separate routes of invasion of *L. lili* with distinctive patterns of dispersal.

## Introduction

Invasive species are widely known to be key drivers of human-caused global environmental change. They represent the second greatest threat to biodiversity, after habitat destruction, and seriously impact the productivity of agricultural and forestry systems, as well as ecosystem processes that are fundamental to human health and well-being (Mack *et al.* 2000; Pimentel *et al.* 2001; Pejchar and Mooney 2009; Donovan *et al.* 2013). Developing efficient strategies to prevent invasions of new exotic species and to manage those already established are crucial to constrain their negative effects. A crucial step while developing such strategies is to retrace the routes of invasion of introduced species (Estoup and Guillemaud 2010).

Retracing the routes of invasion of an exotic species implies elucidating the history of the invasion process, identifying the area of origin and characterizing the geographical pathways followed by the founders of the invading population(s). This provides useful information about the source and genetic composition of invading populations (Dlugosch and Parker 2008), which later facilitates the design of strategies for preventing and managing biological invasions. For example, if the invasive process is characterized by recurrent introductions, identifying the geographic origin of the introduced species can allow the design of specific monitoring and quarantine measures targeting specific source areas. Retracing the routes of invasion can also facilitate the design of measures for controlling invasive populations. For example, when biological control management is applied, knowing the geographic origin of the invasive population can guide the search for biocontrol agents from the same origin, as they may possess local adaptations enabling a more efficient control of the invasive species (Waage 1990; Hufbauer and Roderick 2005).

Two methods are used to infer routes of invasion. Direct methods rely on current and historical observations of invasive species, provided by routine controls, quarantine services or monitoring. This approach provides chronological information suggesting the progression of invasive species in new territories, particularly for species that can be easily and rapidly detected (e.g., Suarez *et al.* 2001; Tatem *et al.* 2006). However, direct methods rarely deliver a



high degree of precision (Estoup and Guillemaud 2010). Indirect methods are based on spatial patterns of genetic variation within and among populations in both the invaded and native ranges. They are considered more accurate and informative since they provide qualitative and quantitative information on the genetic relationships among populations. However, this approach also bears its own weaknesses because the stochasticity of the demographic and genetic history of sampled populations cannot fully be taken into account (Estoup and Guillemaud 2010).

Amongst indirect methods, genetic clustering analyses, like those implemented in STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000), are frequently used for identifying the origin of invasive populations (Rollins *et al.* 2009; Boissin *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2014). For example, the origin of various invasive populations can be inferred when they cluster clearly with potential source populations (Darling *et al.* 2008). Thus, genetic clustering analyses are appropriate to evaluate if invasion processes are characterized by multiple introductions (Alda *et al.* 2013; Shirk *et al.* 2014). The construction of dendrograms (e.g., neighbour-joining trees) (Thibault *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2014) or principal coordinate analysis (PCoA) (Zhang *et al.* 2010; Shirk *et al.* 2014), both generated from matrices of genetic distance between populations, are also commonly used to evaluate the genetic structure of invasive species. Population allocation approaches, generated from calculations of assignment likelihood, have also proven useful when trying to identify the origin of invasive population(s) (Pascual *et al.* 2007; Ciosi *et al.* 2008; Tepolt *et al.* 2009). Recently, Approximate Bayesian Computation has also been used to compare the likelihood of plausible introduction scenarios (Guillemaud *et al.* 2010); these scenarios are often initially inspired from results of the above methods and the validity of conclusions depends on the choice of tested scenarios (Pelletier and Carstens 2014).

The lily leaf beetle (*Lilioceris lili* Scopoli) (Coleoptera: Chrysomelidae) is a Eurasian herbivore originally distributed across the Palearctic region, ranging from Portugal (Audisio 2011) to northeastern China (Yu *et al.* 2001) and from Siberia (Berti and Rapilly 1976) to North Africa (Labeyrie 1963). Despite the fact that the true native distribution of this species has been recently questioned (Orlova-Bienkowskaja 2013), we assume in this paper that *L. lili* is native to Eurasia. *Lilioceris lili* was observed in North America for the first time in 1943 on

the Island of Montréal, Québec, Canada (LeSage 1983), most likely introduced through the importation of ornamental lilies. Historical information suggests that *L. lili* was confined to the Island of Montréal for approximately 25 years (LeSage 1983; P. de Tonnancour, personal communication), and next expanded its range in all directions including the USA, where it was first observed in 1992 (Day 1993). As of now, *L. lili* is present in all Canadian provinces, except for British Columbia and Saskatchewan, and in all New England states in USA, in addition to the states of New York and Washington. The historical information on the distribution of *L. lili* in North America is deemed reliable: this conspicuous scarlet beetle is mainly found in urban gardens where it, and the damages it causes on lilies, can hardly go unnoticed.

Despite all the information available on the first observations of *L. lili* specimens across North America, many questions remain about its invasion history. First, did the population that initially established in Montréal spawn all other populations in North America? In other words, were there one or several introductions of *L. lili*? If multiple introductions occurred, genetic groups in the invasive range should each share genetic characteristics with Eurasian populations from their source areas. Second, field observations suggest a rapid expansion of the species starting in the early 1990s, but it is unclear whether and how this progression originated from the population established in Montréal. That is, what are the geographical pathways used by *L. lili* during its progression on the North American continent? The distribution of invading lineages, coupled with temporal information on dates of first observation and patterns of change in genetic diversity would help identify routes of dispersion and suggest major demographic effects during dispersion. To address these questions, we characterized the genetic structure of *L. lili* across the entire invasive range in North America as well as in part of the native European range.

## **Material and methods**

### **Biological material**

We sampled 516 specimens of *L. lili* in 9 locations in Europe and 25 locations in North America between 2009 and 2013 (Fig. 2.1, Table 2.1). All specimens were collected on ornamental lilies in private or public gardens, or on indigenous lilies in their natural habitat. Most individuals (83%) were collected at the adult stage and then preserved in 95% EtOH. Others were collected as eggs or larvae and reared on ornamental lilies until they reached the adult stage.

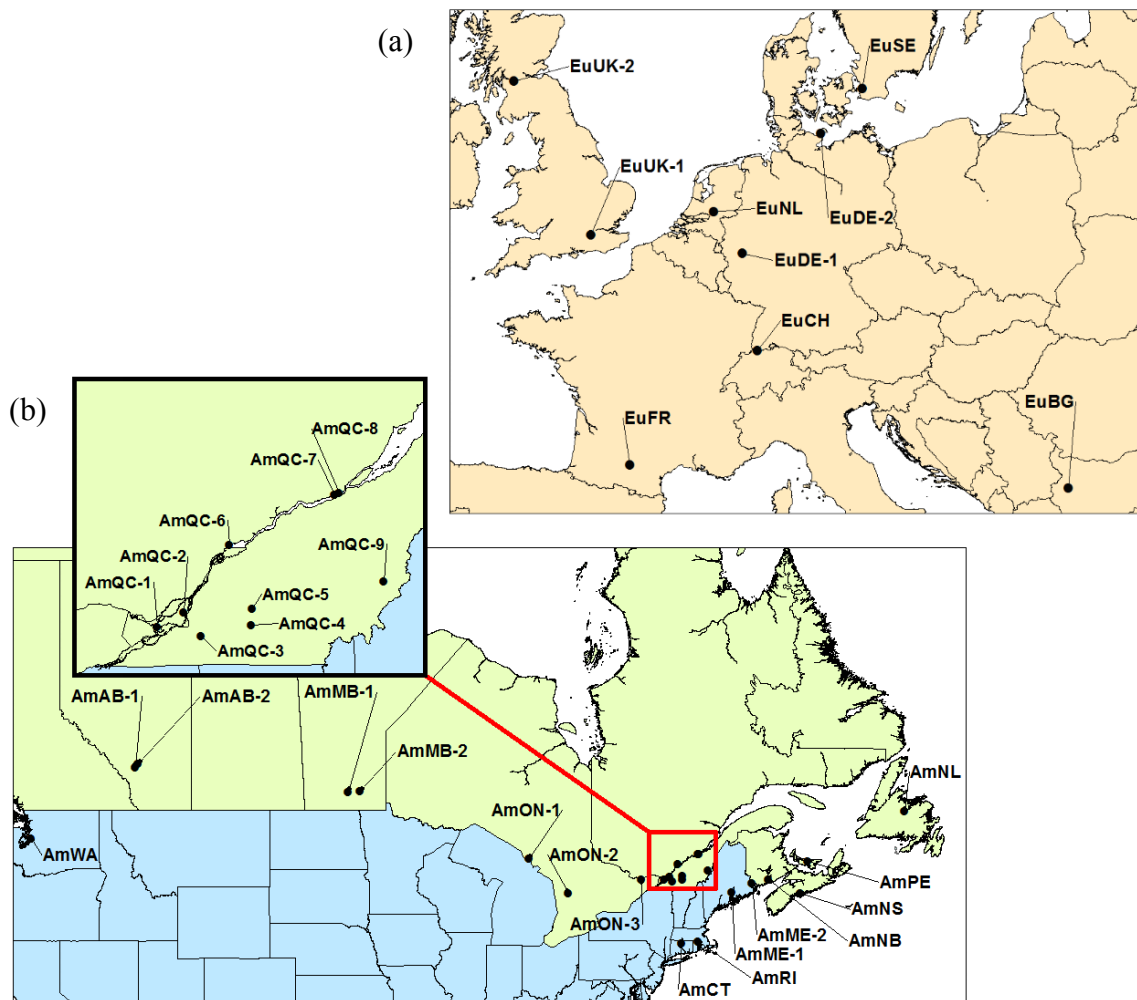
### **Genetic characterization**

DNA was extracted from abdomen tissues using DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) following the manufacturer's protocol and DNA quality was assessed on 2% agarose gels. DNA quantity was measured using spectrophotometry and samples were diluted to 40 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ .

We used Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) to characterize 10-16 individuals per location, except for a location in The Netherlands (EuNL, N=4) (Table 2.1). AFLP fragments were generated following the AFLP<sup>®</sup> Plant Mapping protocol of Applied Biosystems for the restriction-ligation and the preselective PCR steps. Selective PCR was performed with three *EcoRI/MseI* primer pairs (ACC/CTC, ACG/CTC and ACT/CAC) using a final concentration of 0.7X QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA), 1.0  $\mu\text{L}$  0.1X pre-selective PCR, and 0.5  $\mu\text{M}$  of each selective primer. Selective PCR cycles were as follows: an initial activation step of 15 min at 95°C; 10 cycles of 20 s denaturation step at 94°C, 30 s annealing step beginning at 66°C and ending at 57°C and a 2 min extension step at 72°C; 20 cycles of 20 s at 94°C, 30 s at 56°C and a 2 min at 72°C; and a final extension cycle at 60°C for 30 min.

Selective PCR products were mixed in a 1.5:1:1 ratio for electrophoresis on a 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) at the Plate-forme d'Analyse Génomique of Université Laval. AFLP profiles were checked and scored manually using the GENEMAPPER v. 3.7 analysis software (Applied Biosystems) with a minimum relative fluorescence of 200 units. A total of 335 AFLP loci were amplified, of which 182 were polymorphic using a 5%

criterion within continent. Loci present in at least 25% of the individuals of a given location were also retained. Forty-eight genotypes (9.3% of total individuals) were replicated from the extraction step and yielded a low genotyping error rate of 0.36% (37 errors out of 10 290 comparisons) (Bonin *et al.* 2004).



**Fig. 2.1** Sampling locations for *L. lili* in (a) Europe and (b) North America.

**Table 2.1** Description of sampling locations for *L. lili* in Europe and North America, sample sizes, and indices of genetic diversity (PLP: proportion of polymorphic loci, H<sub>j</sub>: Nei's gene diversity, SE: standard error).

Code	City, Province / State, Country	Number of individuals	PLP	H <sub>j</sub> ± SE	Spatial coordinate	
					Latitude	Longitude
AmWA	Bellevue, Washington, USA	16	38.5	0.140 ± 0.014	47.59	-122.19
AmAB-1	Calgary, Alberta, Canada	14	8.2	0.040 ± 0.008	51.13	-114.24
AmAB-2	Airdrie, Alberta, Canada	16	6.0	0.037 ± 0.007	51.29	-114.01
AmMB-1	Oakville, Manitoba, Canada	15	7.1	0.038 ± 0.008	49.92	-98.00
AmMB-2	Winnipeg, Manitoba, Canada	16	12.6	0.068 ± 0.011	49.94	-97.10
AmON-1	Sault Ste Marie, Ontario, Canada	16	7.1	0.046 ± 0.008	46.51	-84.27
AmON-2	Sauble Beach, Ontario, Canada	16	11.0	0.058 ± 0.010	44.65	-81.24
AmON-3	Ottawa, Ontario, Canada	16	10.4	0.061 ± 0.010	45.39	-75.71
AmQC-1	Sainte-Anne-de-Bellevue, Québec, Canada	16	28.0	0.087 ± 0.012	45.40	-73.95
AmQC-2	Montréal, Québec, Canada	16	26.9	0.085 ± 0.012	45.56	-73.56
AmQC-3	Saint-Jean-sur-Richelieu, Québec, Canada	16	27.5	0.097 ± 0.013	45.31	-73.31
AmQC-4	Granby, Québec, Canada	16	12.6	0.071 ± 0.011	45.42	-72.57
AmQC-5	Roxton Falls, Québec, Canada	15	13.7	0.069 ± 0.011	45.59	-72.55
AmQC-6	Yamachiche, Québec, Canada	16	28.0	0.081 ± 0.011	46.24	-72.90
AmQC-7	Cap-Rouge, Québec, Canada	16	28.0	0.086 ± 0.012	46.76	-71.35
AmQC-8	Sainte-Foy, Québec, Canada	16	29.1	0.092 ± 0.012	46.78	-71.28
AmQC-9	Saint-Gédéon, Québec, Canada	16	12.6	0.060 ± 0.010	45.87	-70.63
AmCT	Windsor, Connecticut, USA	15	44.0	0.172 ± 0.015	41.85	-72.66
AmRI	Cumberland, Rhode Island, USA	16	38.5	0.142 ± 0.014	41.98	-71.38
AmME-1	Winterport, Maine, USA	16	36.8	0.129 ± 0.014	44.69	-68.83
AmME-2	Calais, Maine, USA	14	41.2	0.159 ± 0.014	45.18	-67.27
AmNB	Rothsay, New Brunswick, Canada	16	36.8	0.111 ± 0.012	45.38	-66.00
AmNS	Halifax, Nova Scotia, Canada	14	25.3	0.078 ± 0.011	44.65	-63.58
AmPE	Grand Tracadie, Prince Edward Island, Canada	16	4.4	0.027 ± 0.007	46.39	-63.04
AmNL	Grand Falls, Newfoundland, Canada	16	6.6	0.036 ± 0.008	48.94	-55.65
EuFR	Toulouse, Haute-Garonne, France	16	47.8	0.173 ± 0.014	43.54	1.49
EuUK-1	Surrey, South-East, England	16	54.4	0.199 ± 0.014	51.31	-0.47
EuUK-2	Glasgow, Glasgow, Scotland	16	47.8	0.181 ± 0.014	55.88	-4.29
EuNL	Ede, Gelderland, The Netherlands	4	48.9	0.231 ± 0.015	52.02	5.65
EuCH	Möhlín, Aargau, Switzerland	16	59.3	0.218 ± 0.014	47.55	7.83
EuDE-1	Bonn, North Rhine-Westphalia, Germany	16	61.5	0.220 ± 0.013	50.72	7.09
EuDE-2	Heiligenhafen, Schleswig-Holstein, Germany	16	38.5	0.151 ± 0.014	54.37	10.98
EuSE	Alnarp, Skåne, Sweden	15	49.5	0.187 ± 0.014	55.65	13.07
EuBG	Sofia, Sofia-Capital, Bulgaria	10	51.1	0.177 ± 0.014	42.70	23.33

## **Data analysis**

### *Genetic clustering*

Genetic clustering was used to evaluate the number of invasive populations of *L. lili* in North America and potentially trace back their origin in Europe. The Bayesian model-based clustering software STRUCTURE v. 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000; Falush *et al.* 2007) was used to infer the most probable number of genetic groups (K). Analyses were performed with the entire dataset (K = 1 to 10) as well as for each continent separately (K = 1 to 15 in North America; K = 1 to 9 in Europe), with 10 repetitions for each value of K. An initial burn-in period of 10 000 was followed by 100 000 iterations using the recessive allele model with admixture but no a priori information on population location. For each analysis, the most probable K-value was inferred using the guidelines provided by Pritchard *et al.* (2000) and Evanno *et al.* (2005) as implemented by the software STRUCTURE HARVESTER (Earl 2012). Results were permuted with CLUMPP (Jakobsson and Rosenberg 2007) and graphics were displayed with DISTRUCT v. 1.1 (Rosenberg 2004). As a complement to the clustering approach, a principal coordinate analysis (PCoA; Orlóci 1978) was conducted on a pairwise mean genetic distance matrix between all locations in GENALEX v. 6.5 (Peakall and Smouse 2006, 2012).

### *Population allocation*

Population allocation was used to determine the most likely geographic origin of invasive *L. lili* populations established in North America. The allocation and simulator program AFLPOP v. 1.2 (Duchesne and Bernatchez 2002) was used to allocate North American individuals to their most probable population of origin in Europe. The minimal log-likelihood difference (MLD) threshold for allocation was set to 1 (Duchesne and Bernatchez 2002). This way, an individual was allocated to a potential source population in Europe only if its genotype was ten times more likely in that population relative to any other populations; otherwise it was not allocated to any population.

## *Genetic differentiation and diversity*

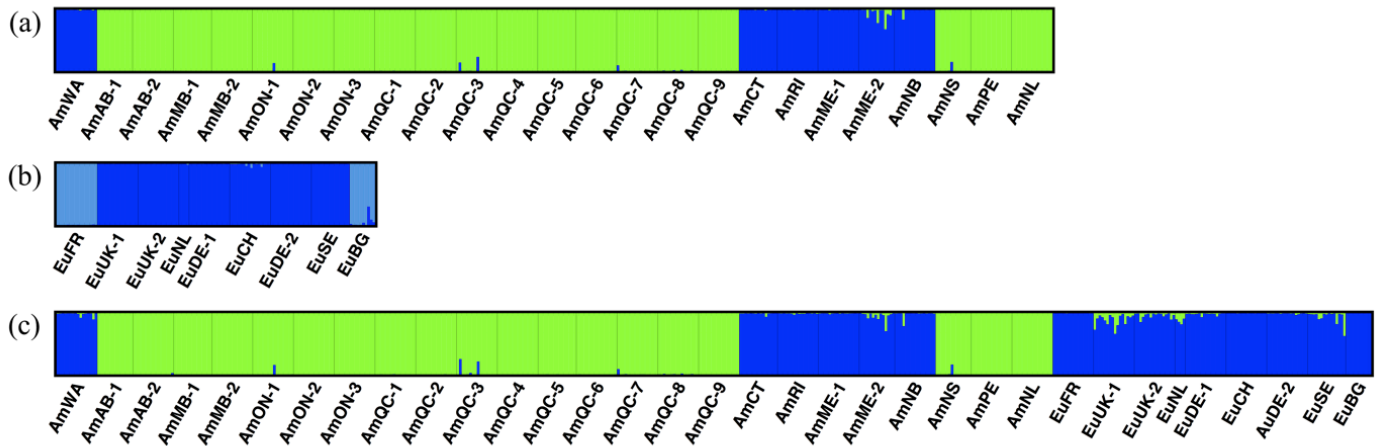
Genetic differentiation between locations and between genetic clusters was estimated with  $F_{ST}$  in ARLEQUIN v. 3.5 (Excoffier *et al.* 2005). Significant p-values were obtained by comparing observed  $F_{ST}$  estimates with a null distribution created by 1000 random permutations. Significance levels were adjusted following the sequential Bonferroni correction technique (Rice 1989). Genetic diversity within each location was estimated as the proportion of polymorphic loci (PLP) and Nei's gene diversity ( $H_j$ ) with AFLPSURV v. 1.0 (Vekemans *et al.* 2002). Wilcoxon rank sum tests (R Development Core Team 2013) were used to compare diversity indices between genetic clusters.

## **Results**

### **Genetic clustering**

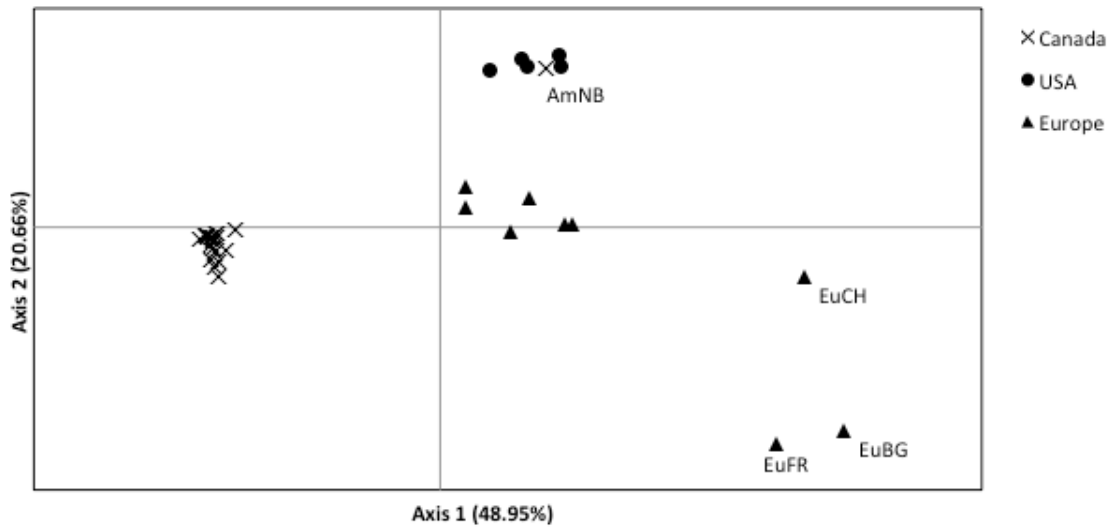
Using Evanno's criterion ( $\Delta K$ ), the preferred value of  $K$  was clearly  $K = 2$  for each of the three levels analysed: North America, Europe, and both continents combined (Fig. 2.2, see Appendix SI). In North America, individuals formed two clusters largely corresponding to each country. The 'Canada cluster' comprised all individuals sampled in Canada except those from New Brunswick (AmNB), while the 'USA cluster' comprised all individuals collected in this country plus those from New Brunswick (Fig. 2.2a). In Europe, individuals from France (EuFR) and Bulgaria (EuBG) formed a distinct genetic cluster, while the remaining individuals formed the second cluster (Fig. 2.2b). When all individuals were analysed together, the same Canada cluster was identified. However, the structure within Europe was no longer apparent and the Europe and USA clusters were combined into a second cluster (Fig. 2.2b vs. c). Guidelines from Pritchard *et al.* (2000) suggested higher  $K$  values for all three analyses (see Appendix SI). However, the allocations of individuals among clusters proved unstable across the 10 iterations, so higher  $K$  values are not considered any further in this paper.

The PCoA revealed similar genetic clustering amongst North American locations (Fig. 2.3). Locations of the Canada cluster form a group that is clearly apart from all other locations along PCoA axis 1 (explaining 49% of the variation). Locations included in the USA cluster (USA and AmNB) are similar to most locations in Europe on the first axis, but form a distinct group on Axis 2 (explaining 21% of the variation). In Europe, samples from France (EuFR) and Bulgaria (EuBG) have extreme values on both axes. Given that STRUCTURE also identified these locations as distinct, they are hereafter referred to as the ‘Southern Europe’ cluster. In contrast, and although samples from Switzerland occupy a somewhat intermediate position, this and all other locations are hereafter referred to as the ‘Northern Europe’ cluster.



**Fig. 2.2** Clustering of *L. lili* genotypes from (a) North America, (b) Europe and (c) North America and Europe provided by STRUCTURE for  $K = 2$ . Locations are presented following a west to east gradient.

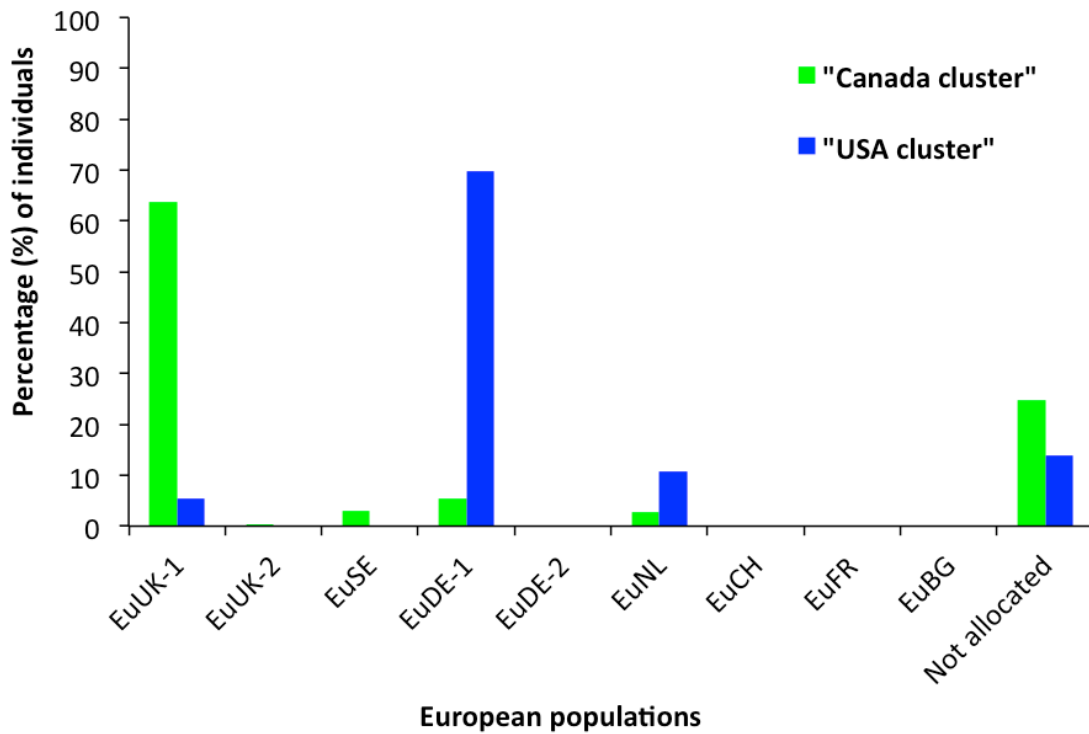




**Fig. 2.3** Principal Coordinate Analysis (PCoA) based on the mean genetic distance between 34 locations where *L. lilii* was sampled in Europe and North America. Symbols represent sampled regions. Locations not clearly clustering within their regions are identified (AmNB, EuBG, EuFR, and EuCH; see Table 2.1).

### Population allocation

Population allocation analysis strongly suggests that individuals from the Canada and USA clusters have genetic affinities with distinct geographic areas in Europe (Fig. 2.4). Individuals from the Canada cluster are mainly allocated to one sample from southern UK (EuUK-1, 64%), whereas individuals from the USA cluster are mainly allocated to one sample from southern Germany (EuDE-1, 70%). Only 7% of the North American individuals were allocated to the other European locations and none of them were allocated to Southern Europe (EuFR, EuBG), EuCH, or EuDE-2 (Fig. 2.4). These results were obtained with a relatively high allocation threshold (MLD = 1) nevertheless allowing for the successful allocation of 78% of the individuals. When MLD was set to 0, the same pattern was observed, but with higher rates of allocation: 71% of the individuals from the Canada cluster were allocated to EuUK-1 and 75% of the individuals from the USA cluster were allocated to EuDE-1 (Results not shown).



**Fig. 2.4** Allocation of *L. lili* AFLP individual genotypes from the Canada cluster and the USA cluster to European locations. A minimum log-likelihood difference (MLD) of 1 was used as a threshold for allocation in AFLPOP v1.2.

### Genetic differentiation and diversity

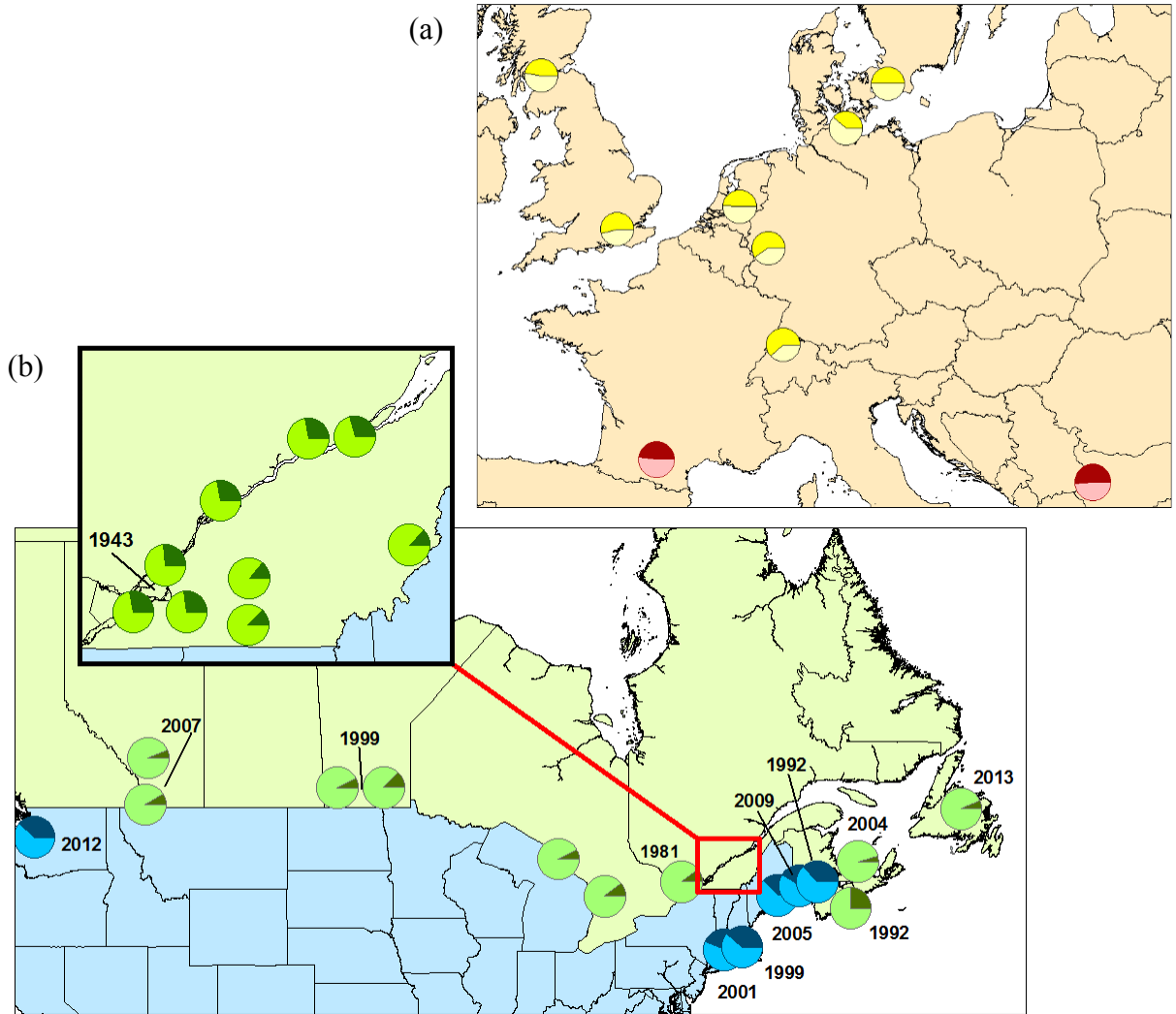
Genetic differentiation between sampling sites reflected cluster boundary as well as geographical proximity within cluster (see Appendix SII).  $F_{ST}$  values were generally high (mean = 0.47) and significant, with the exception of some closely located sites that were not significantly differentiated (e.g., AmQC-7 and AmQC-8). Genetic differentiation between the four genetic clusters concurs with results from the clustering analyses (Table 2.2). Differentiation is highest between the Canada cluster and the USA and the European clusters, and lowest between the USA cluster and Northern Europe.

**Table 2.2** Pairwise  $F_{ST}$  estimates between *L. lili* genetic clusters in Europe and North America. Adjusted significant p-values, following the sequential Bonferroni correction technique (Rice 1989), are indicated above the diagonal.

	Canada	USA	Northern Europe	Southern Europe
Canada		***	***	***
USA	0.49		***	***
North Europe	0.40	0.20		***
South Europe	0.63	0.40	0.30	

\*\*\* =  $p \leq 0.0001$ .

Genetic diversity per location was significantly lower in North America than in Europe (Table 2.1, Fig. 2.5). Indeed, both PLP and H<sub>j</sub> estimates were significantly lower in the Canada cluster (Wilcoxon test,  $p < 0.0001$  and  $p < 0.0001$ , respectively) and the USA cluster (Wilcoxon test,  $p < 0.01$ , and  $p < 0.01$ , respectively) than in Europe (Fig. 2.5). Within North America, PLP (Wilcoxon test,  $p < 0.001$ ) and H<sub>j</sub> (Wilcoxon test,  $p < 0.0001$ ) were higher in the USA cluster than in the Canada cluster (Fig. 2.5b). Within Canada, locations where *L. lili* has been reported more recently (e.g., AmAB, AmMB, AmPE, AmNL) tended to have lower genetic diversity than locations where they have been present for a longer time (e.g., AmQC, AmNS) (Fig. 2.5b). This pattern is not observed within the US cluster, with all locations displaying similar levels of diversity.



**Fig. 2.5** Genetic diversity of *L. lili* estimated for each location in (a) Europe and (b) North America. The dark areas of pie charts represent the proportion of polymorphic loci (PLP) at each location. The color of pie charts represents the genetic cluster of each locations (yellow: Northern Europe, red: Southern Europe, green: Canada, blue: USA). When available, years of first observation of *L. lili* in North America are indicated next to each location.

## Discussion

The genetic structure of *L. lili* populations points towards a minimum of two different *L. lili* invasions in North America, both originating from northern Europe. In combination with dates

of first mention of *L. lili* in different localities throughout the invaded range, a scenario involving two distinct episodes of invasion can be inferred. A first introduction occurred in Montréal, Québec, Canada in the early 1940's from individuals potentially originating from the southern United Kingdom. A second introduction took place near Cambridge, Massachusetts, USA, in the early 1990's with beetles potentially coming from western Germany. Both invasive populations then appear to have spread independently mostly within the country where they had first been introduced.

### **Two sources of introduction**

Evidence for more than one source of introduction in the invaded range is first provided by the occurrence of two distinct and highly differentiated *L. lili* genetic groups with non-overlapping distributions in North America. The two clustering analyses clearly identified the same grouping of populations in Canada and the USA, the sole exception being a site located near the US/Canada border at the Maine/New Brunswick interface. This spatial genetic structure could in principle have developed within a single invading lineage, but such a high level of genetic distinctiveness between genetically diverse clusters is unlikely to have evolved in just a few decades.

Stronger evidence for two independent introductions from different source areas in the native range comes from patterns of genetic similarity between the two North American lineages and the genetic groups and populations sampled in Europe. All analyses indicate that the USA cluster originated in Northern Europe. Bayesian clustering grouped the USA cluster with Europe, while genetic distances (PCoA) allowed excluding southern Europe as a likely source area. Population allocation analyses further circumscribed the likely area of origin to western Germany. Given the relatively low number of locations in the European native range, western Germany may only be representative of the genetic composition of the true area of origin. Nonetheless, evidence for the origin of this invasion in northern Europe is strengthened by the total absence of USA genotypes being allocated to any of the southernmost European locations.

The Canada cluster is much more distinct from European samples than the USA cluster, but there is nevertheless strong support for an origin in southern England. Admittedly, clustering analyses and  $F_{ST}$  estimates attest to the stronger genetic distinctiveness of the Canada cluster and suggest that it has little genetic affinities with European populations. On the basis of these results alone, one could suspect that the geographic origin of the Canada cluster had not been sampled. Indeed, failure to include samples from the true area of origin is a recognized problem when using genetic analyses to reconstruct invasions (Darling *et al.* 2008; Estoup and Guillemaud 2010; Guillemaud *et al.* 2010; Boissin *et al.* 2012). However, the population allocation analysis does provide support for an origin in southern England given the high proportion of individuals from Canada allocated to one specific sample (EuUK-1). These results are robust given the stringency of the allocation threshold (MLD set to 1), but again, we cannot completely exclude that the true area of origin had not been sampled. We note, however, that the high stringency of the analysis should have led to a higher rate of unsuccessful allocations if none of the potential source population shared similarities with individuals from the Canada cluster. As for the obviously higher level of genetic distinctiveness of the Canada cluster, one possible explanation is that the invasion is much older than for the USA cluster (by more than 50 years), and that reduction in genetic diversity precluded the clustering of impoverished invasive populations with native populations bearing many distinct alleles. As demonstrated by Pascual *et al.* (2007), genetic allocation may be particularly efficient at identifying source populations when introduced populations endured a strong founder event and/or when source populations display only weak differentiation, as is apparently the case in *L. lili* from northern Europe.

Finally, it is worth considering that *L. lili* populations from Asia were not analysed in this study but that they are also potential sources for the invasion in North America. However, if they were the true source populations, we would have likely observed a higher rate of unsuccessful allocations. Furthermore, an Asian origin for the *L. lili* invasion in North America is very unlikely because population densities of the beetle in Asia are very low and mainly found on wild lilies in natural habitats (Yu *et al.* 2001; Orlova-Bienkowskaja 2013). Also, oversea activities (commercial exchange, tourism, and immigration are more important between North America and Europe than with Asian countries. This is particularly true for lily

trade, since most of the lilies imported in North America come from Europe (mainly The Netherlands), and rarely continental Asia (Buschman 2004).

### **Pattern of dispersal along two separate routes of invasion**

Dates of first observations of *L. lili* across North America, coupled to levels of genetic diversity across locations, indicate independent routes of invasion and contrasting pace of dispersal for each invading lineage. In Canada, the invasion dates back to the 1940's, with dispersal from the point of entry starting only after a long lag period and being accompanied by noticeable reduction in genetic diversity in the more recently established populations. Populations first established in Montréal where they remained confined for about 25 years. Once recorded outside of Québec, in the Ottawa region in 1981, the beetle started to rapidly spread eastward and westward across Canada. Expansion rate cannot be precisely estimated but likely exceeds natural dispersion of this species. Genetic diversity relative to the native area was severely reduced upon introduction but was apparently maintained around Montréal during the lag period characterized by low dispersal. In more recently invaded areas, further reduction in genetic diversity suggests that small propagule sizes were transported afar. In contrast, the USA invasion occurred more recently, and the geographical spread of *L. lili* began soon after introduction with no appreciable loss of genetic diversity. Beetles entered the USA near Cambridge in the early 1990's and were found in all surrounding states within 10 years. Although genetic diversity had been lost relative to the native area (but less so than in Canada), it remains relatively stable throughout the area invaded by this lineage. Loss of genetic diversity is expected upon serial founding events unless dispersal involves source population(s) with high within-population diversity, relatively large propagule sizes and/or multiple introductions events (Shirk *et al.* 2014). Distinguishing between these possibilities is impossible with the available data.

The two lineages experienced different pace and routes of dispersion but they are now in close proximity in New Brunswick, Canada, the only location where genetic clustering did not match international political boundaries. Our results strongly suggest that the *L. lili* population present in this site resulted from the progression of beetles from the USA cluster

into Canada. The two invasive lineages do not appear to have hybridized yet since there were no individuals with mixed ancestry at this or neighbouring sites in Canada or the USA. However, we predict that *L. lili* from Maine and New Brunswick (USA cluster) will hybridize with individuals from the Canadian Maritimes (Canada cluster) in the near future.

We suggest that the progression of *L. lili* in both Canada and USA results from a combined process of natural short-range and anthropogenic long-range dispersal, also called stratified dispersal (Liebhold and Tobin 2008). Short-range dispersal of invasive organisms arises from natural dispersion and population growth and is usually characterized by continuous diffusion. Fine scale spreading of *L. lili* documented by Majka and Kirby (2011) in Maine, USA, the colonisation of wild lilies by *L. lili* in natural habitat (Bouchard *et al.* 2008; Majka and LeSage 2008), and the lack of genetic differentiation between some nearby sampling sites illustrate aspects of short-range dispersal of the beetle. While short-range dispersal of invasive organisms is usually constant and predictable, long-range dispersal through anthropogenic means, meteorological events, animal vectors or other mechanisms is unpredictable and typically leads to a faster rate of range expansion (Liebhold and Tobin 2008). The rapid and recent spread of *L. lili* to Manitoba, Alberta, Newfoundland and Washington State illustrates episodes of long-range dispersal. The notably low genetic diversity measured in populations sampled in remote Canadian locations, probably caused by bottleneck events following dispersal, supports the hypothesis that these populations established following long-range dispersal. However, no bottleneck event seemed to have taken place in the Washington State population compared to the Canadian populations. We are not able with the present study to explain this phenomenon. However, a large number of founding individuals and/or a large number of introduction events in Washington State could explain the absence of a bottleneck event (Shirk *et al.* 2014).

A similar case of stratified dispersal was observed for the gypsy moth, *Lymantria dispar*, in North America. Airborne first instar larvae on silken threads were the main agents of short-distance dispersal. However, the movement of gypsy moth beyond the infested zone was largely attributed to inadvertent transportation of various life stages by humans (Whitmire and Tobin 2006), since new infestations were associated with the movement of human



households from infested to uninfested zones (McFadden and McManus 1991). In the case of *L. lili*, we suspect that anthropogenic dispersal was mediated by the lily trade within both countries or by transportation of contaminated lily plants by amateur horticulturists (LeSage and Elliott 2003; Majka and LeSage 2008).

## Conclusions and perspectives

Based on our results, there were at least two events of *L. lili* introduction in North America from different source areas in Europe, and each lineage expanded independently in distinct areas of Canada and USA. On one hand, our study adds to the evidence that multiple introductions of exotic species in a new territory is a common phenomenon (See Dlugosch and Parker 2008) across taxa, habitats and regions. Examples of multiple introductions include the Cuban Lizard in Florida (Kolbe *et al.* 2004), the shrub Scotch broom in Oceania (Kang *et al.* 2007), the European green crab worldwide (Darling *et al.* 2008) and the common racoon in Spain (Alda *et al.* 2013). On the other hand, our study also exemplifies the synergetic effect of combining a variety of indirect, genetic methods with field observations (dates of first mention). Genetic clustering methods alone can provide conclusive information about the origin of invasive populations when they cluster with native population(s) (Darling *et al.* 2008; Marrs *et al.* 2008; Rosenthal *et al.* 2008; Rollins *et al.* 2009). For *L. lillii*, as for other taxa such as *Drosophila subobscura* in North America (Pascual *et al.* 2007), the western corn rootworm in Europe (Ciosi *et al.* 2008) and the European green crab in the northeastern Pacific (Tepolt *et al.* 2009), genetic population allocation was also necessary to identify areas where the first invaders likely originated. Finally, and importantly, the availability of dated observations was highly instrumental by providing the timeframe and pace of dispersal within the two distinct invasions.

Evidence for multiple introductions of *L. lili* in North America, and for their separate routes of invasion, also provides useful information regarding management strategies of invasive exotic species. First, this study shows that multiple introductions of invasive exotic

species can lead to faster progression of those species in their invaded territory. Indeed, approximately 70 years after being introduced for the first time in North America, our genetic analysis reveals that the *L. lili* Canadian populations have not progressed south of the border. We could therefore assume that no populations would currently be present in the USA if there had not been a second introduction in northeastern USA. Such a pattern illustrates the importance of retracing the origin of invasive populations to implement proper monitoring and quarantine measures from the source area to prevent further introductions.

Second, knowing the probable origins of the *L. lili* invasive populations in North America provides novel information that could benefit the biological control strategy against this pest. The introduction of parasitoids from Europe is considered a promising strategy to reduce *L. lili* populations on ornamental and native lilies in North America since effective natural biological control is observed in Europe (Kenis *et al.* 2003; Casagrande and Kenis 2004). Three European parasitoid species were introduced in New England between 1999 and 2004, all of which successfully established (Casagrande and Tewksbury 2007; Cappuccino *et al.* 2013). In Canada, biological control started in 2010 when *Tetrastichus setifer* Thomson (Eulophidea), the most widely spread *L. lili* parasitoid in Europe, was released in Ottawa (Cappuccino *et al.* 2013). Released parasitoids were all from populations located in northern Germany (Ostenfeld, Osterrönfeld and Heiligenhafen) and Switzerland (Delémont) in continental Europe (N. Cappuccino, personal communication), and thus outside the likely area of origin of the Canadian populations. However, as suggested for classical biological control (Roderick and Navajas 2003; Hufbauer and Roderick 2005), it would be interesting in the future to select biocontrol agents from the source of invasion, that is parasitoids originating from the southern part of the United Kingdom, and to evaluate in laboratory conditions their ability to parasitize Canadian populations of *L. lili*. If their performance is similar or better than the parasitoids originating from northern Germany and Switzerland, it would be appropriate to select and release those parasitoids in the field to improve control of *L. lili* in Canada.

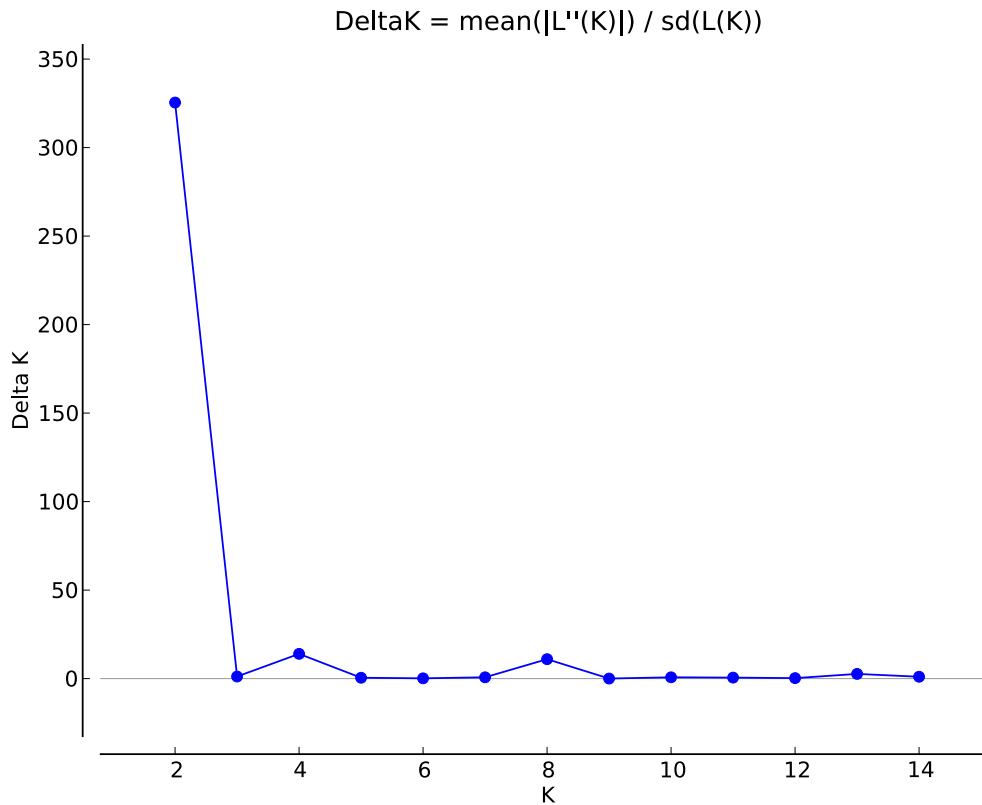
## **Acknowledgements**

We thank Josée Doyon, Alexandra Saad and Alexandre Leblanc for their help in the field; Audrey Bourret, Geneviève Parent, Éric Devost and Xavier Prairie for technical assistance in the laboratory; and all lily leaf beetles collectors who kindly provided samples from across Europe and North America. The Canada Research Chair in Biological Control provided financial support to this project.

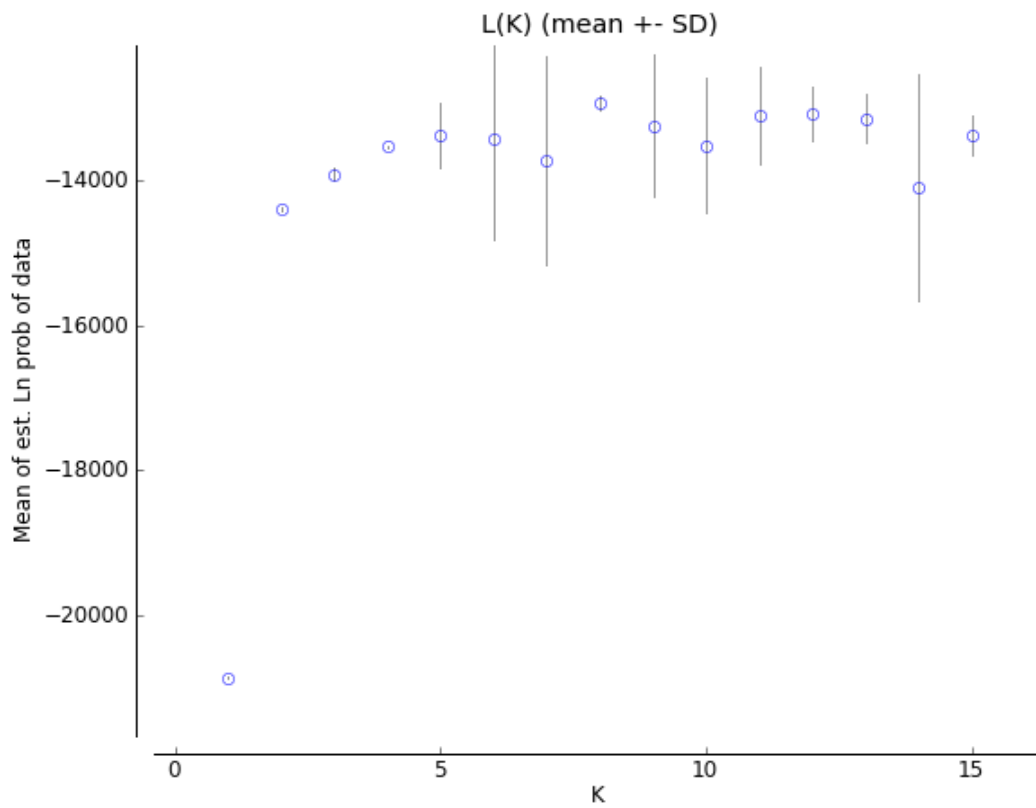
## **Appendix SI – Genetic clustering complementary analysis**

Results of the (*ad hoc*) estimates used to determine the most probable number of genetic groups (K) following the guidelines provided by Evanno *et al.* (2005) and Pritchard *et al.* (2000) while using STRUCTURE v. 2.3.4 (See main text for details on how analyses were run). According to Evanno *et al.* (2005), the preferred K value is based on the modal (highest) value of delta ( $\Delta$ ) K, a quantity based on the second order rate of change with respect to K of the likelihood function. According to Pritchard *et al.* (2000), the preferred K value is based on the highest, and least variable, estimated log probability of data  $\Pr(X|K)$  between each value of K.

When analyzing only the North American individuals, the preferred value of K is 2 according to the modal value of  $\Delta K$  (Fig. A1.1), while the preferred value of K is 4 according to the estimated log probability of data  $\Pr(X|K)$  (Fig. A1.2).

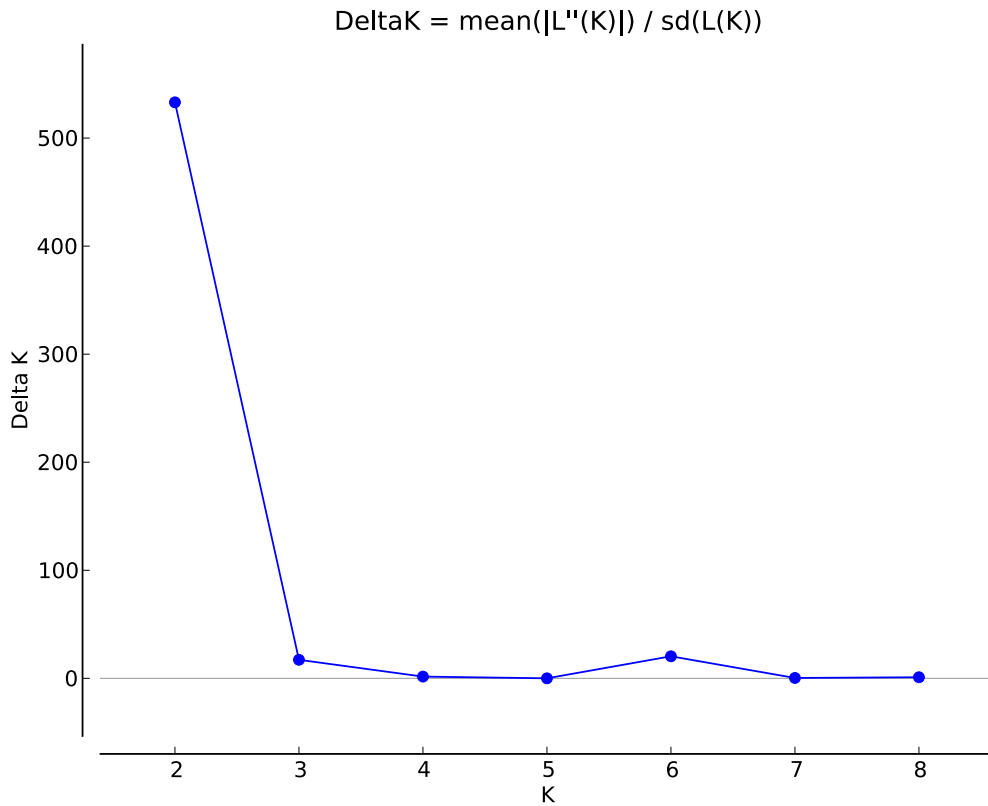


**Fig. A1.1**  $\Delta K$  for each K values according to the guidelines provided by Evanno *et al.* (2005) for the North American individuals. Preferred value of  $K = 2$ .

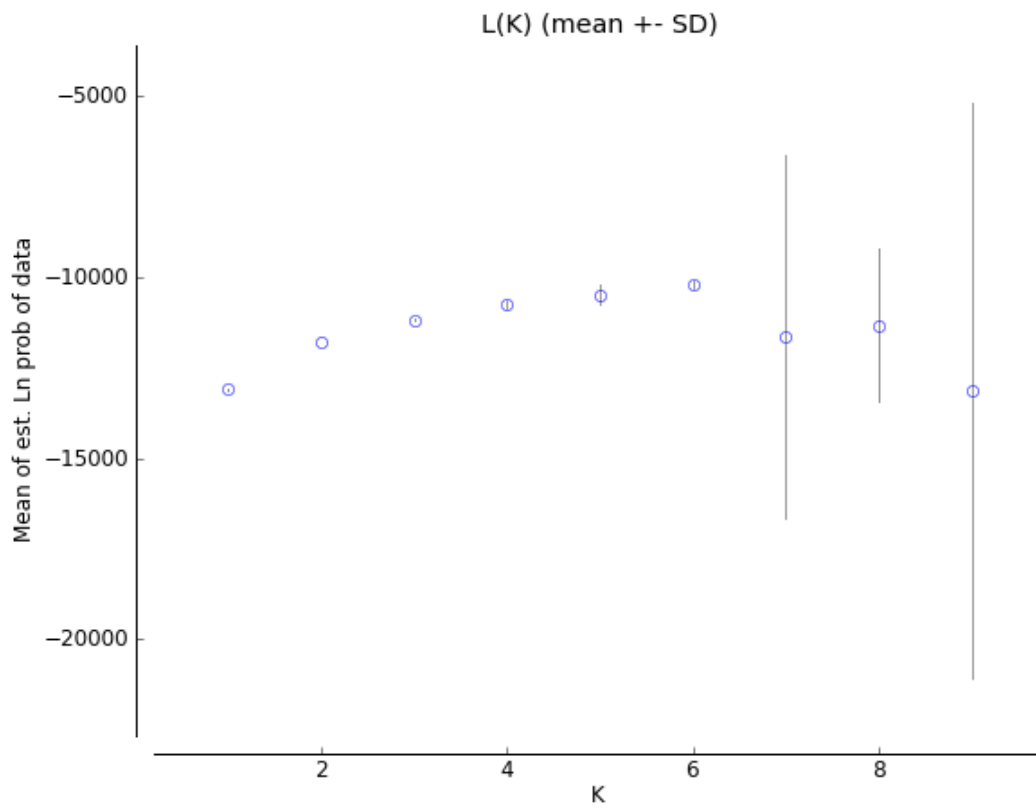


**Fig. A1.2** Mean L(K) ( $\pm$ SD) for each K values according to the guidelines provided by Pritchard *et al.* (2000) for the North American individuals. Preferred value of K=4.

When analyzing only the European individuals, the preferred value of K is 2 according to the modal value of  $\Delta K$  (Fig. A1.3), while the preferred value of K is 3 according to the estimated log probability of data  $\Pr(X|K)$  (Fig. A1.4) since it is slightly less variable than those observed at  $K = 4, 5, 6$ .



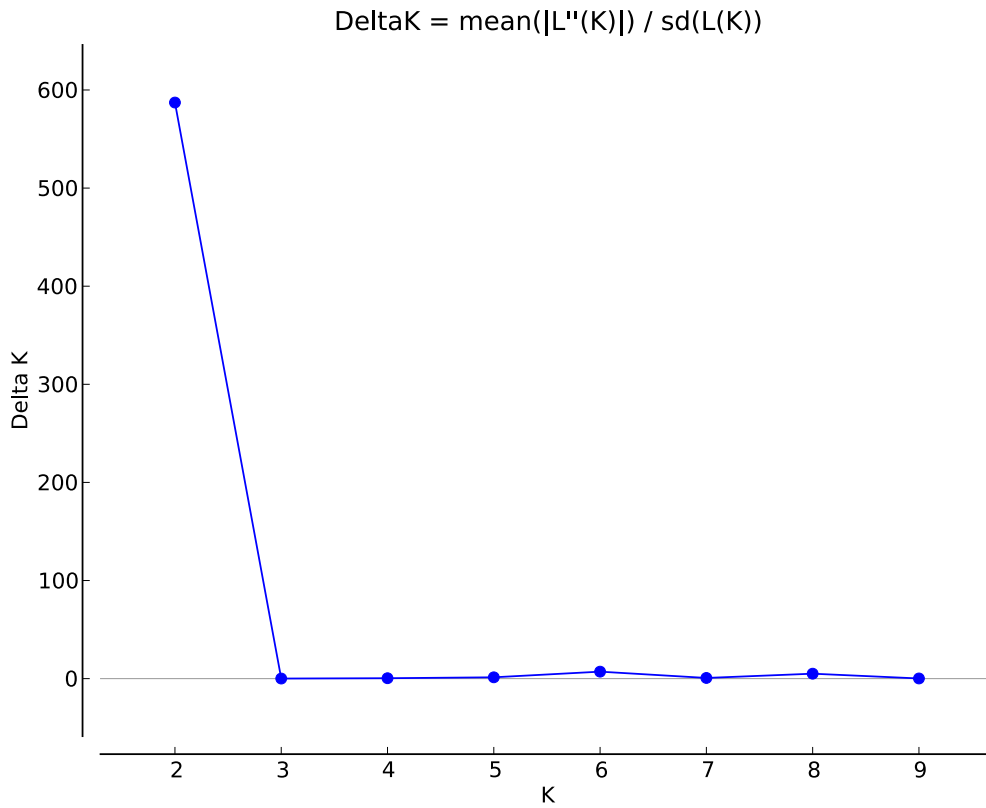
**Fig. A1.3**  $\Delta K$  for each K values according to the guidelines provided by Evanno *et al.* (2005) for the European individuals. Preferred value of  $K = 2$ .



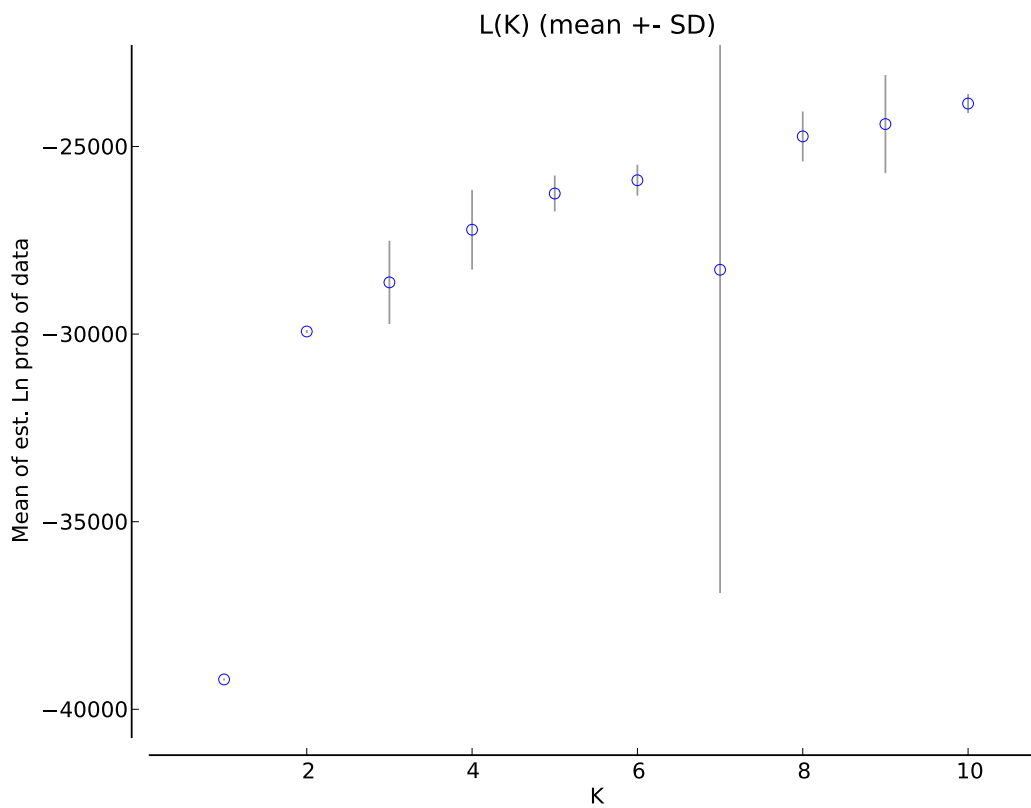
**Fig. A1.4** Mean  $L(K)$  ( $\pm$ SD) for each  $K$  values according to the guidelines provided by Pritchard *et al.* (2000) for the European individuals. Preferred value of  $K = 3$ .



When analyzing all individuals, the preferred value of K is 2 according to the modal value of  $\Delta K$  (Fig. A1.5). The same preferred K value was obtained according to the estimated log probability of data  $\Pr(X|K)$  (Fig. A1.6).



**Fig. A1.5**  $\Delta K$  for each K values according to the provided by Evanno *et al.* (2005) for all individuals. Preferred value of K = 2.



**Fig. A1.6** Mean  $L(K)$  ( $\pm$ SD) for each  $K$  values according to the guidelines provided by Pritchard *et al.* (2000) for all individuals. Preferred value of  $K = 2$ .

# Appendix SII – Genetic differentiation between sampling sites

**Table A2.1** Pairwise  $F_{ST}$  values calculated by ARLEQUIN for all locations sampled. P-values were obtained by comparing observed  $F_{ST}$  estimates with a null distribution created by 1000 random permutations. Significance levels were adjusted following the sequential Bonferroni correction technique (Rice 1989). Bold values represent non-significant  $F_{ST}$  values.

	AmWA	AmAB-1	AmAB-2	AmMB-1	AmMB-2	AmON-1	AmON-2	AmON-3	AmQC-1	AmQC-2	AmQC-3	AmQC-4	AmQC-5	AmQC-6	AmQC-7	AmQC-8	AmQC-9	AmCT	AmRI	AmME-1	AmME-2	AmNB	AmNS	AmPE	AmNL	EuFR	EuUK-1	EuUK-2	EuNL	EuDE-1	EuCH	EuDE-2	EuSE	EuBG
AmWA	-	0.67	0.69	0.69	0.64	0.65	0.66	0.63	0.60	0.61	0.59	0.64	0.63	0.61	0.60	0.58	0.64	0.21	0.20	0.34	0.22	0.31	0.62	0.70	0.71	0.58	0.38	0.40	0.35	0.31	0.42	0.48	0.38	0.58
AmAB-1	0.67	-	0.39	0.64	0.52	0.61	0.42	0.44	0.32	0.36	0.34	0.41	0.50	0.38	0.33	0.28	0.41	0.60	0.65	0.70	0.62	0.75	0.38	0.37	0.58	0.66	0.48	0.57	0.63	0.48	0.57	0.64	0.51	0.69
AmAB-2	0.69	0.39	-	0.69	0.58	0.65	0.55	0.52	0.41	0.45	0.38	0.52	0.54	0.41	0.37	0.36	0.44	0.64	0.68	0.73	0.64	0.76	0.43	0.57	0.68	0.67	0.52	0.60	0.66	0.51	0.59	0.66	0.54	0.71
AmMB-1	0.69	0.64	0.69	-	0.47	0.67	0.43	0.50	0.36	0.39	0.39	0.35	0.57	0.41	0.43	0.33	0.61	0.64	0.68	0.73	0.64	0.77	0.36	0.66	0.61	0.68	0.53	0.59	0.66	0.50	0.58	0.65	0.54	0.72
AmMB-2	0.64	0.52	0.58	0.47	-	0.53	0.38	0.18	0.20	0.22	0.22	0.23	0.29	0.17	0.22	0.18	0.49	0.60	0.63	0.69	0.59	0.72	0.33	0.58	0.61	0.66	0.47	0.54	0.55	0.45	0.54	0.62	0.47	0.69
AmON-1	0.65	0.61	0.65	0.67	0.53	-	0.58	0.47	0.40	0.40	0.42	0.47	0.52	0.50	0.42	0.40	0.55	0.61	0.64	0.70	0.62	0.73	0.54	0.72	0.68	0.67	0.50	0.56	0.63	0.47	0.56	0.64	0.50	0.70
AmON-2	0.66	0.42	0.55	0.43	0.38	0.58	-	0.24	0.21	0.27	0.28	0.23	0.42	0.22	0.27	0.24	0.41	0.61	0.65	0.69	0.61	0.74	0.36	0.45	0.55	0.67	0.48	0.56	0.60	0.48	0.57	0.63	0.49	0.69
AmON-3	0.63	0.44	0.52	0.50	0.18	0.47	0.24	-	0.11	0.14	0.12	0.23	0.24	0.14	0.16	0.16	0.32	0.59	0.62	0.68	0.58	0.70	0.31	0.48	0.55	0.65	0.45	0.52	0.55	0.45	0.54	0.62	0.45	0.68
AmQC-1	0.60	0.32	0.41	0.36	0.20	0.40	0.21	0.11	-	0.05	0.07	0.14	0.16	0.05	0.04	0.08	0.29	0.55	0.59	0.65	0.55	0.67	0.19	0.40	0.45	0.63	0.41	0.48	0.48	0.41	0.52	0.58	0.43	0.65
AmQC-2	0.61	0.36	0.45	0.39	0.22	0.40	0.27	0.14	<b>0.05</b>	-	0.01	0.10	0.13	0.11	0.07	0.04	0.23	0.57	0.60	0.66	0.55	0.68	0.22	0.40	0.43	0.63	0.43	0.51	0.49	0.42	0.53	0.59	0.42	0.66
AmQC-3	0.59	0.34	0.38	0.39	0.22	0.42	0.28	0.12	0.07	<b>0.01</b>	-	0.17	0.14	0.09	0.02	0.03	0.21	0.55	0.58	0.64	0.53	0.66	0.20	0.35	0.41	0.62	0.41	0.50	0.47	0.41	0.51	0.58	0.41	0.65
AmQC-4	0.64	0.41	0.52	0.35	0.23	0.47	0.23	0.14	0.10	0.17	-	0.22	0.18	0.17	0.12	0.34	0.59	0.63	0.67	0.59	0.71	0.28	0.44	0.49	0.66	0.46	0.53	0.53	0.45	0.55	0.60	0.46	0.68	
AmQC-5	0.63	0.50	0.54	0.57	0.29	0.52	0.42	0.24	0.16	0.13	0.14	0.22	-	0.15	0.16	0.12	0.36	0.60	0.63	0.69	0.58	0.71	0.35	0.50	0.57	0.65	0.45	0.53	0.55	0.45	0.55	0.62	0.46	0.69
AmQC-6	0.61	0.38	0.41	0.41	0.17	0.50	0.22	0.14	<b>0.05</b>	0.11	0.09	0.18	0.15	-	0.05	0.05	0.31	0.57	0.60	0.66	0.55	0.68	0.24	0.44	0.51	0.64	0.43	0.51	0.50	0.44	0.53	0.60	0.45	0.66
AmQC-7	0.60	0.33	0.37	0.43	0.22	0.42	0.27	0.16	<b>0.04</b>	0.07	<b>0.02</b>	0.17	0.16	<b>0.05</b>	-	0.05	0.26	0.56	0.60	0.65	0.55	0.68	0.23	0.39	0.47	0.63	0.42	0.50	0.50	0.43	0.52	0.59	0.43	0.66
AmQC-8	0.58	0.28	0.36	0.33	0.18	0.40	0.24	0.16	0.08	<b>0.04</b>	<b>0.03</b>	0.12	0.12	<b>0.05</b>	<b>0.05</b>	-	0.25	0.53	0.57	0.63	0.51	0.66	0.15	0.31	0.36	0.61	0.42	0.49	0.46	0.41	0.50	0.57	0.42	0.64
AmQC-9	0.64	0.41	0.44	0.61	0.49	0.55	0.41	0.32	0.29	0.23	0.21	0.34	0.36	0.31	0.26	0.25	-	0.61	0.63	0.69	0.60	0.71	0.42	0.48	0.56	0.64	0.46	0.55	0.58	0.46	0.55	0.61	0.46	0.68
AmCT	0.21	0.60	0.64	0.64	0.60	0.61	0.61	0.59	0.55	0.57	0.55	0.59	0.60	0.57	0.56	0.53	0.61	-	0.04	0.12	0.12	0.28	0.58	0.65	0.66	0.52	0.36	0.37	0.29	0.30	0.36	0.45	0.34	0.51
AmRI	0.20	0.65	0.68	0.68	0.63	0.64	0.65	0.62	0.59	0.60	0.58	0.63	0.63	0.60	0.60	0.57	0.63	0.04	-	0.16	0.10	0.26	0.61	0.69	0.70	0.56	0.39	0.41	0.36	0.33	0.41	0.49	0.39	0.56
AmME-1	0.34	0.70	0.73	0.73	0.69	0.70	0.69	0.68	0.65	0.66	0.64	0.67	0.69	0.66	0.65	0.63	0.69	0.12	0.16	-	0.18	0.30	0.67	0.74	0.75	0.59	0.43	0.46	0.42	0.39	0.44	0.52	0.42	0.58
AmME-2	0.22	0.62	0.64	0.64	0.59	0.62	0.61	0.58	0.55	0.55	0.53	0.59	0.58	0.55	0.55	0.51	0.60	0.12	0.10	0.18	-	0.27	0.57	0.66	0.67	0.55	0.35	0.37	0.28	0.31	0.39	0.46	0.35	0.54
AmNB	0.31	0.75	0.76	0.77	0.72	0.73	0.74	0.70	0.67	0.68	0.66	0.71	0.71	0.68	0.68	0.66	0.71	0.28	0.26	0.30	0.27	-	0.70	0.78	0.78	0.61	0.46	0.47	0.47	0.41	0.46	0.54	0.42	0.61
AmNS	0.62	0.38	0.43	0.36	0.33	0.54	0.36	0.31	0.19	0.22	0.20	0.28	0.35	0.24	0.23	0.15	0.42	0.58	0.61	0.67	0.57	0.70	-	0.33	0.30	0.61	0.45	0.53	0.52	0.43	0.53	0.60	0.47	0.65
AmPE	0.70	0.37	0.57	0.66	0.58	0.72	0.45	0.48	0.40	0.40	0.35	0.44	0.50	0.44	0.39	0.31	0.48	0.65	0.69	0.74	0.66	0.78	0.33	-	0.54	0.68	0.52	0.61	0.70	0.52	0.60	0.68	0.55	0.73
AmNL	0.71	0.58	0.68	0.61	0.61	0.68	0.55	0.55	0.45	0.43	0.41	0.49	0.57	0.51	0.47	0.36	0.56	0.66	0.70	0.75	0.67	0.78	0.30	0.54	-	0.67	0.52	0.61	0.71	0.51	0.60	0.68	0.55	0.72
EuFR	0.58	0.66	0.67	0.68	0.66	0.67	0.67	0.65	0.63	0.63	0.62	0.66	0.65	0.64	0.63	0.61	0.64	0.52	0.56	0.59	0.55	0.61	0.61	0.68	0.67	-	0.46	0.48	0.44	0.41	0.40	0.53	0.42	0.37
EuUK-1	0.38	0.48	0.52	0.53	0.47	0.50	0.48	0.45	0.41	0.43	0.41	0.46	0.45	0.43	0.42	0.42	0.46	0.36	0.39	0.43	0.35	0.46	0.45	0.52	0.52	0.46	-	0.18	0.21	0.21	0.34	0.39	0.21	0.47
EuUK-2	0.40	0.57	0.60	0.59	0.54	0.56	0.56	0.52	0.48	0.51	0.50	0.53	0.51	0.50	0.49	0.55	0.37	0.41	0.46	0.37	0.47	0.53	0.61	0.61	0.48	0.18	-	0.19	0.18	0.33	0.38	0.24	0.47	
EuNL	0.35	0.63	0.66	0.66	0.55	0.63	0.60	0.55	0.48	0.49	0.47	0.53	0.55	0.50	0.50	0.46	0.58	0.29	0.36	0.42	0.28	0.47	0.52	0.70	0.71	0.44	0.21	0.19	-	0.11	0.23	0.35	0.13	0.42
EuDE-1	0.31	0.48	0.51	0.50	0.45	0.47	0.48	0.45	0.41	0.42	0.41	0.45	0.45	0.44	0.43	0.41	0.46	0.30	0.33	0.39	0.31	0.41	0.43	0.52	0.51	0.41	0.21	0.18	0.11	-	0.22	0.30	0.17	0.37
EuCH	0.42	0.57	0.59	0.58	0.54	0.56	0.57	0.54	0.52	0.53	0.51	0.55	0.55	0.53	0.52	0.50	0.55	0.36	0.41	0.44	0.39	0.46	0.53	0.60	0.60	0.40	0.34	0.33	0.23	0.22	-	0.31	0.23	0.33
EuDE-2	0.48	0.64	0.66	0.65	0.62	0.64	0.63	0.62	0.58	0.59	0.58	0.60	0.62	0.60	0.59	0.57	0.61	0.45	0.49	0.52	0.46	0.54	0.60	0.68	0.68	0.53	0.39	0.38	0.35	0.30	0.31	-	0.26	0.49
EuSE	0.38	0.51	0.54	0.54	0.47	0.50	0.49	0.45	0.43	0.42	0.41	0.46	0.46	0.45	0.43	0.42	0.46	0.34	0.39	0.42	0.35	0.42	0.47	0.55	0.55	0.42	0.21	0.24	0.13	0.17	0.23	0.26	-	0.41
EuBG	0.58	0.69	0.71	0.72	0.69	0.70	0.69	0.68	0.65	0.66	0.65	0.68	0.69	0.66	0.66	0.64	0.6																	

## References

- Alda F, Ruiz-López MJ, García FJ, *et al.* (2013) Genetic evidence for multiple introduction events of raccoons (*Procyon lotor*) in Spain. *Biological Invasions* 15:687-698
- Audisio P (2011) Fauna Europaea : *Lilioceris lili*. In: Fauna Europaea version 2.4. [http://www.faunaeur.org/full\\_results.php?id=243537](http://www.faunaeur.org/full_results.php?id=243537), Accessed: 11/05/2012
- Berti N, Rapilly M (1976) Liste d'espèces et révision du genre *Lilioceris* Reitter (Col. Chrysomelidae). In Faune d'Iran. *Annales de la Société Entomologique de France* (Nouvelle série), France, pp. 31-73
- Boissin E, Hurley B, Wingfield M, *et al.* (2012) Retracing the routes of introduction of invasive species: the case of the *Sirex noctilio* woodwasp. *Molecular Ecology* 21:5728-5744
- Bonin A, Bellemain E, Bronken Eidesen P, *et al.* (2004) How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology* 13:3261-3273
- Bouchard AM, McNeil JN, Brodeur J (2008) Invasion of American native lily populations by an alien beetle. *Biological Invasions* 10:1365-1372
- Buschman J (2004) Globalisation-flower-flower bulbs-bulb flowers. IX International Symposium on Flower Bulbs 673. pp. 27-33
- Cappuccino N, Haye T, Tewksbury LA, *et al.* (2013) *Lilioceris lili* (Scopoli), Lily Leaf Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). eds: Mason PG and Gillespie DR, In Biological control programmes in Canada 2001-2012. CABI Publishing, Oxfordshire, UK,
- Casagrande RA, Kenis M (2004) Evaluation of lily leaf beetle parasitoids for North American introduction. eds: Van Driesche RG and Reardon R, In Assessing host ranges of parasitoids and predators used for classical biological control: a guide to best practice. USDA Forest Service Publication FHTET-2004-03. USDA, Morgantown, WV, USA, pp. 121-137
- Casagrande RA, Tewksbury LA (2007) Lily leaf beetle biological control. Research Report to the North American Lily Society, University of Rhode Island, RI, USA
- Ciosi M, Miller N, Kim K, *et al.* (2008) Invasion of Europe by the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*: multiple transatlantic introductions with various reductions of genetic diversity. *Molecular Ecology* 17:3614-3627
- Darling JA, Bagley MJ, Roman J, *et al.* (2008) Genetic patterns across multiple introductions of the globally invasive crab genus *Carcinus*. *Molecular Ecology* 17:4992-5007

- Day R (1993) *Lilioceris lili*. A report to E.O. Stockbridge, OIC, APHIS, 10 Causeway St., Boston, MA, USA
- Dlugosch K, Parker I (2008) Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology* 17:431-449
- Donovan GH, Butry DT, Michael YL, Prestemon JP, Liebhold AM, Gatzliolis D, Mao MY (2013) The relationship between trees and human health: Evidence from the spread of the emerald ash borer. *Am J Prev Med* 44:139-145
- Duchesne P, Bernatchez L (2002) AFLPOP: a computer program for simulated and real population allocation, based on AFLP data. *Molecular Ecology Notes* 2:380-383
- Earl DA (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4:359-361
- Estoup A, Guillemaud T (2010) Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what? *Molecular Ecology* 19:4113-4130
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611-2620
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics online* 1:47
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7:574-578
- Guillemaud T, Beaumont MA, Ciosi M, *et al.* (2010) Inferring introduction routes of invasive species using approximate Bayesian computation on microsatellite data. *Heredity* 104:88-99
- Hufbauer RA, Roderick GK (2005) Microevolution in biological control: mechanisms, patterns, and processes. *Biological Control* 35:227-239
- Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23:1801-1806
- Kang M, Buckley YM, Lowe AJ (2007) Testing the role of genetic factors across multiple independent invasions of the shrub Scotch broom (*Cytisus scoparius*). *Molecular Ecology* 16:4662-4673
- Kenis M, Haye T, Casagrande RA, *et al.* (2003) Selection and importation of European parasitoids for the biological control of the lily leaf beetle in North America, and prospects for control in Europe, pp. 416-419. In, *The Proceedings of the 1st*

International Symposium on Biological Control of Arthropods, 14-18 January 2002, Honolulu, Hawaii, USA.

Kolbe JJ, Glor RE, Schettino LR, *et al.* (2004) Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. *Nature* 431:177-181

Labeyrie V (1963) *Lilioceris*. ed Balachowsky AS, In Entomologie Appliquée à l'Agriculture, Tome 1. Masson & Cie, Paris, France, pp. 588–595

LeSage L (1983) Note sur la distribution présente et future du criocère du lys, *Lilioceris lili* Scopoli (Coleoptera: Chrysomelidae), dans l'est du Canada. *Le Naturaliste Canadien* 110:95–97

LeSage L, Elliott B (2003) Major range extension of the lily leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae), a pest of wild and cultivated Liliaceae. *The Canadian Entomologist* 135:587-588

Liebholt AM, Tobin PC (2008) Population Ecology of Insect Invasions and Their Management\*. *Annu. Rev. Entomol.* 53:387-408

Mack RN, Simberloff D, Lonsdale MW, *et al.* (2000) Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecological Applications* 10:689-710

Majka CG, Kirby C (2011) Lily leaf beetle, *Lilioceris lili* (Coleoptera: Chrysomelidae), in Maine and the Maritime Provinces: the continuing dispersal of an invasive species. *Journal of the Acadian Entomological Society* 7:70-74

Majka CG, LeSage L (2008) Introduced leaf beetles of the maritime provinces, 5: The lily leaf beetle, *Lilioceris Lili* (Scopoli) (Coleoptera : Chrysomelidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 110:186-195

Marrs R, Sforza R, Hufbauer R (2008) Evidence for multiple introductions of *Centaurea stoebe micranthos* (spotted knapweed, Asteraceae) to North America. *Molecular Ecology* 17:4197-4208

McFadden MW, McManus ME (1991) An insect out of control? The potential for spread and establishment of the gypsy moth in new forest areas in the United States.

Orlóci L (1978) *Multivariate analysis in vegetation research*. Junk, The Hague, The Netherlands

Orlova-Bienkowskaja MJ (2013) Dynamics of the range of lily leaf beetle (*Lilioceris lili*, Chrysomelidae, Coleoptera) indicates its invasion from Asia to Europe in the 16th–17th century. *Russian Journal of Biological Invasions* 4:93-104

- Pascual M, Chapuis M, Mestres F, *et al.* (2007) Introduction history of *Drosophila subobscura* in the New World: a microsatellite-based survey using ABC methods. *Molecular Ecology* 16:3069-3083
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6:288-295
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28:2537-2539
- Pejchar L, Mooney HA (2009) Invasive species, ecosystem services and human well-being. *Trends in Ecology & Evolution* 24:497-504
- Pelletier TA, Carstens BC (2014) Model choice for phylogeographic inference using a large set of models. *Molecular Ecology* 23:3028-3043
- Pimentel D, McNair S, Janecka J, *et al.* (2001) Economic and environmental threats of alien plant, animal, and microbe invasions. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 84:1-20
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959
- R Development Core Team (2013) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43:223-225
- Roderick GK, Navajas M (2003) Genes in new environments: genetics and evolution in biological control. *Nature Reviews Genetics* 4:889-899
- Rollins LA, Woolnough AP, Wilton AN, *et al.* (2009) Invasive species can't cover their tracks: using microsatellites to assist management of starling (*Sturnus vulgaris*) populations in Western Australia. *Molecular Ecology* 18:1560-1573
- Rosenberg NA (2004) DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4:137-138
- Rosenthal DM, Ramakrishnan AP, Cruzan MB (2008) Evidence for multiple sources of invasion and intraspecific hybridization in *Brachypodium sylvaticum* (Hudson) Beauv. in North America. *Molecular Ecology* 17:4657-4669
- Shirk R, Hamrick J, Zhang C, *et al.* (2014) Patterns of genetic diversity reveal multiple introductions and recurrent founder effects during range expansion in invasive populations of *Geranium carolinianum* (Geraniaceae). *Heredity* 112:497-507

- Suarez AV, Holway DA, Case TJ (2001) Patterns of spread in biological invasions dominated by long-distance jump dispersal: insights from Argentine ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:1095-1100
- Tatem AJ, Hay SI, Rogers DJ (2006) Global traffic and disease vector dispersal. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:6242-6247
- Tepolt C, Darling J, Bagley M, *et al.* (2009) European green crabs (*Carcinus maenas*) in the northeastern Pacific: genetic evidence for high population connectivity and current-mediated expansion from a single introduced source population. *Diversity and Distributions* 15:997-1009
- Thibault I, Bernatchez L, Dodson JJ (2009) The contribution of newly established populations to the dynamics of range expansion in a one-dimensional fluvial-estuarine system: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Eastern Quebec. *Diversity and Distributions* 15:1060-1072
- Vekemans X, Beauwens T, Lemaire M, *et al.* (2002) Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular Ecology* 11:139-151
- Waage J (1990) Ecological theory and the selection of biological control agents. eds: Mackauer M, Ehler IE and Roland J, In *Critical issues in biological control*. Intercept, Andover, UK, pp. 135-157
- Whitmire SL, Tobin PC (2006) Persistence of invading gypsy moth populations in the United States. *Oecologia* 147:230-237
- Yu P, Lu W, Casagrande RA (2001) *Lilioceris lili* (Scopoli) occurs in China (Coleoptera: Chrysomelidae). *The Coleopterists Bulletin* 55:65-66
- Zhang B, Edwards O, Kang L, *et al.* (2014) A multi-genome analysis approach enables tracking of the invasion of a single Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia*) clone throughout the New World. *Molecular Ecology* 23:1940-1951
- Zhang YY, Zhang DY, Barrett SC (2010) Genetic uniformity characterizes the invasive spread of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*), a clonal aquatic plant. *Molecular Ecology* 19:1774-1786



### 3. Conclusion générale

L'objectif global de cette étude était de reconstituer les routes d'invasion de *L. lili* en Amérique du Nord. En jumelant les données historiques de premières mentions et les données génétiques obtenues en laboratoire, il a été possible de proposer un scénario d'invasion en Amérique du Nord. En effet, nos résultats indiquent que deux populations sources d'origines différentes se sont fort probablement établies en Amérique du Nord, à des périodes différentes, et que ces dernières ont par la suite progressé de façon indépendante sur le territoire.

Les analyses de regroupement génétique (STRUCTURE et ACoP) se sont avérées fort efficaces pour démontrer la différence génétique entre les individus canadiens (à l'exception de ceux du Nouveau-Brunswick) et états-uniens. Toutefois, l'information générée par ces analyses n'a pas permis de déterminer l'origine probable de ces deux populations en Europe. Malgré le fait que ces analyses ont souvent été utilisées afin de retracer l'origine des populations envahissantes (Darling *et al.* 2008; Rosenthal *et al.* 2008; Rollins *et al.* 2009), notre étude suggère que ces méthodes ne sont pas très efficaces lorsque les populations envahissantes semblent avoir subi une forte diminution de leur diversité génétique (faible diversité génétique en Amérique du Nord par rapport à l'Europe) ou lorsque la structure génétique au sein des populations sources est faible (faible structure génétique en Europe, particulièrement dans le nord). Dans ce type de situation, il est préférable d'utiliser des analyses basées sur des calculs de vraisemblance, sur une base individuelle, pour réaliser de l'assignation populationnelle (Campbell *et al.* 2003; Pascual *et al.* 2007). Ce fut le cas pour notre étude puisque cette approche a permis d'identifier l'origine la plus probable de la population canadienne (sud du Royaume-Uni) et états-unienne (ouest de l'Allemagne) alors qu'il n'avait pas été possible de détecter, avec les analyses de regroupement génétique, de différences génétiques au sein des individus présents dans le nord de l'Europe. Par contre, il faut être prudent lorsque l'on interprète ce genre de résultats puisqu'il se peut que les véritables populations sources n'aient pas été échantillonnées. Ceci est probable dans le cadre de notre étude, puisque nous n'avons pas été en mesure d'obtenir d'échantillons en provenance d'Asie, une région d'origine potentielle (mais peu probable) de *L. lili* en

Amérique. Au final, en considérant le niveau de diversité génétique entre les groupes échantillonnés et les dates de première mention, nous avons pu proposer un scénario de progression de *L. lili* sur le continent nord-américain.

Cette étude démontre qu'il est essentiel d'utiliser plusieurs approches analytiques pour inférer les routes d'invasion d'espèces exotiques envahissantes. En effet, chaque analyse présente ses propres limites, et parfois chacune ne permet de répondre efficacement qu'à une seule des questions. Intégrer plusieurs approches lors d'un exercice aussi complexe que de retracer les routes d'invasion permet alors de dresser un portrait plus complet de la situation. Ainsi, nous sommes en mesure d'être plus critique par rapport aux résultats générés par chaque méthode et de tirer des conclusions justes.

De plus, on peut affirmer que l'utilisation de marqueurs génétiques dominants de type AFLP s'est avérée être une approche adéquate pour répondre à nos objectifs. En effet, il a été possible de générer rapidement, et à faible coût, des profils génétiques suffisamment riches en information pour reconstituer les routes d'invasions de *L. lili*, malgré le fait que nous n'avions pas d'information *a priori* sur le génome de cette espèce, ni de marqueurs établis. Malgré le fait que certains auteurs ont mentionné que cette méthode pourrait bientôt s'avérer obsolète, en outre en raison des nouvelles techniques de génotypage à grande échelle et des problèmes liés à la notation de profils AFLP (Meudt et Clarke 2007), cette étude illustre bien que la procédure d'AFLP est toujours utile et adaptée pour ce genre de travail.

Toutefois, nous reconnaissons que l'utilisation de marqueurs co-dominants (e.g., microsatellites, RFLP, SNP, etc.) permettrait dans certaines mesures d'approfondir les résultats présentés dans cette étude. En effet, les marqueurs co-dominants génèrent plus d'information par locus, car ils permettent de déterminer le génotype exact d'un individu (homozygote ou hétérozygote), alors que les marqueurs dominants nous informent uniquement sur la présence ou non d'un allèle, sans faire de distinction entre un locus homozygote et hétérozygote. Ce gain d'information offrirait la possibilité d'utiliser davantage d'outils analytiques pour mieux comprendre l'histoire d'invasion d'espèces envahissantes, comme la méthode «Approximate Bayesian Computation» (Beaumont *et al.* 2002). Cela permettrait

de comparer différents scénarios d'invasion, comme l'hybridation (*admixture*) génétique entre plusieurs populations sources ou l'ajout de populations sources « fantômes » non-échantillonnées, et de tirer des conclusions pour chacun d'eux (voir Estoup et Guillemaud 2010). En effet, plusieurs études ont récemment eu recours à cette approche afin de retracer avec succès les routes d'invasion d'espèces envahissantes (Miller *et al.* 2005; Pascual *et al.* 2007; Lombaert *et al.* 2010; Boissin *et al.* 2012). Dans notre étude, cela nous aurait permis de tester le scénario d'invasion en Amérique du Nord par le sud du Royaume-Uni et l'ouest de l'Allemagne, en plus de contrôler pour les biais pouvant être engendrés par l'absence d'échantillons provenant de l'Asie.

Notre étude représente la première description génétique de cette espèce envahissante, et ce, à l'échelle mondiale. Ainsi, nous avons mis en évidence un système particulier qui génère d'intéressantes perspectives d'étude. D'une part, nous avons été en mesure de caractériser, de manière préliminaire, l'infection de *L. lili* par l'endosymbiote *Wolbachia* dans différentes régions du monde (voir Annexe I). Les taux d'infection en Europe variaient de 0 à 75% entre les sites échantillonnés, alors qu'aucun individu nord-américain ne semble être infecté, à l'exception d'un seul individu en provenance de Sault-Ste-Marie, Ontario, Canada. D'autres études ont aussi caractérisé l'infection par *Wolbachia* chez des insectes envahissants. Certaines études ont observé une perte totale d'infection chez des populations envahissantes (Shoemaker *et al.* 2000; Reuter *et al.* 2005), une autre a mentionné la présence de *Wolbachia* chez des populations envahissantes (Rey *et al.* 2013). La situation de *L. lili* est quant à elle très intéressante puisque les populations envahissantes de l'Amérique du Nord ne semblent pas être infectées, alors que les populations naturalisées du Royaume-Uni présentent des taux d'infections élevés. Bien que nous soupçonnions que l'absence d'infection chez les populations nord-américaines soit causée par de la dérive génétique au sein des populations introduites et/ou par une contre-sélection de l'infection dans le nouveau territoire, des études plus approfondies permettraient d'identifier plus précisément les mécanismes et facteurs responsables de la disparition de *Wolbachia* chez les populations envahissantes.

Nos résultats offrent d'intéressantes pistes pour le contrôle biologique de *L. lili*, car les différentes populations ayant colonisé le Canada et les États-Unis semblent provenir de deux

régions distinctes en Europe. Cette différence populationnelle devrait être considérée si l'on tente de développer un programme de lutte biologique plus structuré au Canada. Par exemple, il serait intéressant d'introduire au Canada des populations de *Lemophagus errabundus* Gravenhorst (Hymenoptera: Ichneumonidae) en provenance du Royaume-Uni puisque c'est le parasitoïde dominant de la région d'où la population canadienne de *L. lili* semble provenir. Cela permettrait de diversifier les groupes de parasitoïdes introduits jusqu'à maintenant au Canada, car ils se limitent à des populations de *Tetrastichus setifer* Thomson (Eulophidea) en provenance de l'Europe continentale (N. Cappuccino, communication personnelle).

D'autre part, l'invasion du territoire nord-américain par le criocère du lis représente une excellente opportunité de tester l'hypothèse selon laquelle l'adaptation locale est un facteur important à considérer lors de la sélection d'un agent de contrôle en lutte biologique. Bien que ce principe soit souvent mis de l'avant (voir Estoup et Guillemaud 2010), aucune étude n'a encore démontré clairement que cette relation est bénéfique en terme de contrôle biologique (Roderick et Navajas 2003). En Amérique du Nord, nous sommes en présence de deux populations envahissantes ne s'étant pas encore hybridées et qui semblent provenir de régions différentes. De plus, la caractérisation de la biologie de *L. lili* en Europe (Kenis *et al.* 2003) suggère que l'espèce dominante de parasitoïde contrôlant *L. lili* varie en fonction des régions. Il serait donc intéressant d'examiner comment l'efficacité des parasitoïdes à contrôler *L. lili* varie en fonction de leur origine géographique, de leur signature génétique et de la nature de la population nord-américaine de *L. lili* qu'ils parasitent.

## Références

- Beaumont MA, Zhang W, Balding DJ (2002) Approximate Bayesian computation in population genetics. *Genetics* 162:2025-35
- Boissin E, Hurley B, Wingfield M, *et al.* (2012) Retracing the routes of introduction of invasive species: the case of the *Sirex noctilio* woodwasp. *Molecular Ecology* 21:5728-5744

- Campbell D, Duchesne P, Bernatchez L (2003) AFLP utility for population assignment studies: analytical investigation and empirical comparison with microsatellites. *Molecular Ecology* 12:1979-1991
- Darling JA, Bagley MJ, Roman J, *et al.* (2008) Genetic patterns across multiple introductions of the globally invasive crab genus *Carcinus*. *Molecular Ecology* 17:4992-5007
- Estoup A, Guillemaud T (2010) Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what? *Molecular Ecology* 19:4113-4130
- Kenis M, Haye T, Casagrande RA, *et al.* (2003) Selection and importation of European parasitoids for the biological control of the lily leaf beetle in North America, and prospects for control in Europe, pp. 416-419. In, The Proceedings of the 1st International Symposium on Biological Control of Arthropods, 14-18 January 2002, Honolulu, Hawaii, USA.
- Lombaert E, Guillemaud T, Cornuet J-M, *et al.* (2010) Bridgehead effect in the worldwide invasion of the biocontrol harlequin ladybird. *PLOS ONE* 5:e9743
- Meudt HM, Clarke AC (2007) Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in Plant Science* 12:106-117
- Miller N, Estoup A, Toepfer S, *et al.* (2005) Multiple transatlantic introductions of the western corn rootworm. *Science* 310:992-992
- Pascual M, Chapuis M, Mestres F, *et al.* (2007) Introduction history of *Drosophila subobscura* in the New World: a microsatellite-based survey using ABC methods. *Molecular Ecology* 16:3069-3083
- Reuter M, Pedersen JS, Keller L (2005) Loss of *Wolbachia* infection during colonisation in the invasive Argentine ant *Linepithema humile*. *Heredity* 94:364-369
- Rey O, Estoup A, Facon B, *et al.* (2013) Distribution of endosymbiotic reproductive manipulators reflects invasion process and not reproductive system polymorphism in the little fire ant *Wasmannia auropunctata*. *PLOS ONE* 8:e58467
- Roderick GK, Navajas M (2003) Genes in new environments: genetics and evolution in biological control. *Nature Reviews Genetics* 4:889-899
- Rollins LA, Woolnough AP, Wilton AN, *et al.* (2009) Invasive species can't cover their tracks: using microsatellites to assist management of starling (*Sturnus vulgaris*) populations in Western Australia. *Molecular Ecology* 18:1560-1573
- Rosenthal DM, Ramakrishnan AP, Cruzan MB (2008) Evidence for multiple sources of invasion and intraspecific hybridization in *Brachypodium sylvaticum* (Hudson) Beauv. in North America. *Molecular Ecology* 17:4657-4669

Shoemaker DD, Ross KG, Keller L, *et al.* (2000) *Wolbachia* infections in native and introduced populations of fire ants (*Solenopsis spp.*). *Insect Molecular Biology* 9:661-673

# **Annexe I : Caractérisation de l'infection de *Lilioceris lili* par l'endosymbiote *Wolbachia* en Amérique du Nord et en Europe**

## **Introduction**

Le genre *Wolbachia* regroupe des bactéries intracellulaires qui infectent les tissus reproductifs d'arthropodes et de nématodes. *Wolbachia* est transmis de façon verticale via le cytoplasme des œufs infectés. Il a été démontré que cet endosymbiote peut altérer les modes de reproduction de leurs hôtes par incompatibilité cytoplasmique, féminisation des mâles, parthénogenèse et mortalité de la progéniture mâle (Werren *et al.* 2008). *Wolbachia* est très commun chez les insectes. Une méta-analyse a récemment estimé à plus de 65% le taux d'espèces d'insectes infectés, soit plus d'un million d'espèces d'insectes à travers le monde (Hilgenboecker *et al.* 2008). *Wolbachia* serait ainsi le genre de bactéries intracellulaires le plus abondant découvert jusqu'à ce jour. Cependant, un problème soulevé par cette méta-analyse réside dans le fait que la grande majorité des études utilisées n'incluait qu'un seul individu par espèce (~70% des cas) pour le dépistage de cet endosymbiote. Cela signifie que le taux d'insectes infectés par *Wolbachia* est généralement sous-estimé, car des taux d'infection très faibles chez certaines espèces ont déjà été signalés (voir Hilgenboecker *et al.* 2008). De plus, la dynamique spatio-temporelle d'infection de cet endosymbiote est rarement étudiée. Cependant, certaines études sur des espèces de fourmis envahissantes ont révélé que le patron d'infection de *Wolbachia* diffère entre les populations échantillonnées dans l'aire native et celles testées dans l'aire envahie (Shoemaker *et al.* 2000; Reuter *et al.* 2005; Rey *et al.* 2013).

L'étude des routes d'invasion *L. lili* Scopoli, en Amérique du Nord représente une excellente opportunité de caractériser l'infection de *Wolbachia* chez une espèce envahissante. Nous avons donc utilisé une fraction des individus échantillonnés en Amérique du Nord et en Europe afin de détecter la présence de *Wolbachia* par méthode PCR. Nous avons comme

objectif de (1) déterminer si *L. lili* est infecté par l'endosymbiote *Wolbachia* et (2) caractériser le patron d'infection, si tel est le cas, parmi les différentes régions où les individus ont été échantillonnés.

## **Méthodologie**

### **Échantillonnage**

Un total de 434 *L. lili* a été échantillonné parmi 30 sites en Europe et en Amérique du Nord entre 2009 et 2012 (Tableau A3.1). Tous les spécimens ont été récoltés sur des lis ornementaux dans des jardins privés ou publics, ou sur des lis indigènes dans leur habitat naturel. Il s'agit d'un sous-groupe d'échantillons traités au Chapitre 2.



**Tableau A3.1** Liste des sites d'échantillonnage de *L. lili* en Europe et en Amérique du Nord, nombre d'individus échantillonnés par site et résultats des analyses d'infection par *Wolbachia* avec les paires d'amorces 16S spécifiques à *Wolbachia*.

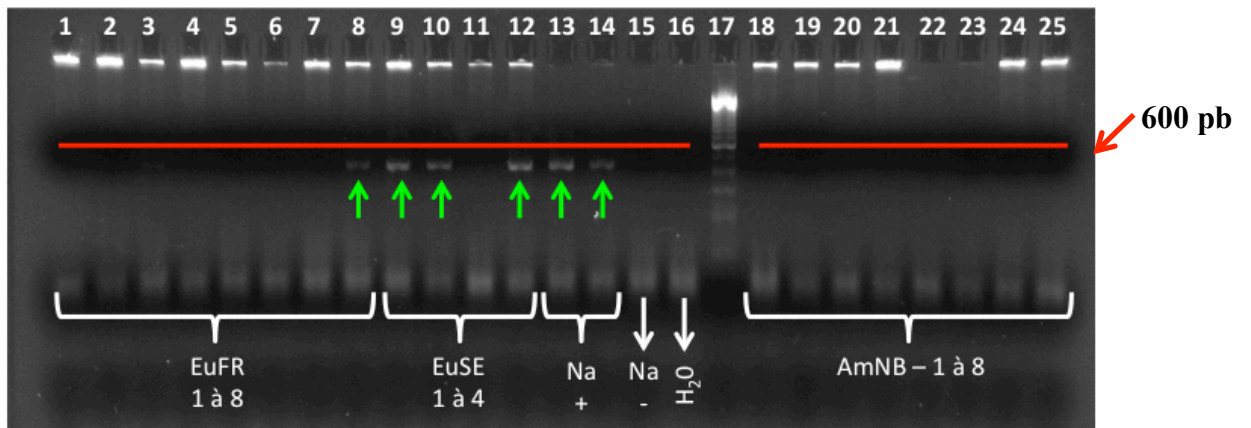
Continent	Code	Ville, Province / État, Pays	Nb d'individus	Nb d'individus infectés (%)
<b>Europe</b>				
	EuFR	Toulouse, Haute-Garonne, France	16	5 (31%)
	EuUK-1	Surrey, South-East, Angleterre	16	12 (75%)
	EuCH	Möhlín, Aargau, Suisse	16	1 (6%)
	EuDE-2	Heiligenhafen, Schleswig-Holstein, Allemagne	16	0
	EuSE	Alnarp, Skåne, Suède	14	10 (71%)
	EuBG	Sofia, Sofia-Capital, Bulgarie	10	0
<b>Amérique du Nord</b>				
	AmWA	Bellevue, Washington, ÉU	16	0
	AmAB-1	Calgary, Alberta, Canada	14	0
	AmAB-2	Airdrie, Alberta, Canada	16	0
	AmMB-1	Oakville, Manitoba, Canada	15	0
	AmMB-2	Winnipeg, Manitoba, Canada	16	0
	AmON-1	Sault Ste Marie, Ontario, Canada	16	1 (6%)
	AmON-2	Sauble Beach, Ontario, Canada	16	0
	AmON-3	Ottawa, Ontario, Canada	16	0
	AmQC-1	Sainte-Anne-de-Bellevue, Québec, Canada	16	0
	AmQC-2	Montréal, Québec, Canada	16	0
	AmQC-3	Saint-Jean-sur-Richelieu, Québec, Canada	16	0
	AmQC-4	Granby, Québec, Canada	15	0
	AmQC-5	Roxton Falls, Québec, Canada	15	0
	AmQC-6	Yamachiche, Québec, Canada	16	0
	AmQC-7	Cap-Rouge, Québec, Canada	16	0
	AmQC-8	Sainte-Foy, Québec, Canada	16	0
	AmQC-9	Saint-Gédéon, Québec, Canada	16	0
	AmCT	Windsor, Connecticut, ÉU	16	0
	AmRI	Cumberland, Rhode Island, ÉU	16	0
	AmME-1	Winterport, Maine, ÉU	16	0
	AmME-2	Calais, Maine, ÉU	14	0
	AmNB	Rothsay, New Brunswick, Canada	16	0
	AmNS	Halifax, Nova Scotia, Canada	14	0
	AmPE	Grand Tracadie, Prince Edward Island, Canada	16	0

## **Extraction d'ADN**

Nous avons extrait l'ADN de chaque individu à partir de tissu abdominal avec l'ensemble DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) en utilisant le protocole du fabricant. La qualité de l'ADN fut vérifiée sur gel d'agarose 2% et la quantité d'ADN fut mesurée par spectrophotométrie. Nous avons par la suite dilué les échantillons d'ADN à  $40 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  pour standardiser la quantité d'ADN amplifié lors de la détection de *Wolbachia*. Nous avons préparé de l'ADN témoin en utilisant des souches de *Nasonia vitripennis* Ashmead (Hymenoptera : Pteromalidae), l'une infectée et l'autre non-infectée par *Wolbachia*. L'ADN fut extrait à partir de 5 adultes en suivant le protocole mentionné ci-haut. Les spécimens de *N. vitripennis* ont été fournis par le laboratoire du Dr Werren (University of Rochester, New York, USA).

## **Conditions PCR**

L'amplification de l'ADN de *Wolbachia* a été faite selon les indications du Dr Werren et s'apparente à celles publiées par son équipe (Werren *et al.* 1995; Werren et Windsor 2000). Les amorces 16S rDNA (ADN ribosomal) utilisées pour le dépistage *Wolbachia* sont 16S-F (CATACTATTTCGAAGGGATAG) et 16S-R (AGCTTCGAGTGAAACCAATTC). Cette paire d'amorces amplifie des fragments de 438 pb lorsque *Wolbachia* est présent. Pour une réaction PCR de  $20.0 \mu\text{L}$ , nous avons utilisé du tampon ThermoPol 1X (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, USA),  $0.1 \text{ mM}$  de dNTPs,  $1.5 \text{ mM}$  de  $\text{MgCl}_2$ ,  $1.0 \mu\text{M}$  de chaque amorce,  $1.5$  Unités de Taq polymérase (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, USA),  $1.0 \mu\text{L}$  d'ADN dilué et  $10.1 \mu\text{L}$  d' $\text{H}_2\text{O}$ . Les conditions d'amplification étaient constituées d'une période de 2 min à  $95^\circ\text{C}$ ; 37 cycles de 30 s à  $95^\circ\text{C}$ , 1 min à  $55^\circ$  et 45 s à  $72^\circ\text{C}$ ; et une étape finale de 10 min à  $72^\circ\text{C}$ . Les produits amplifiés étaient vérifiés par la suite sur gel d'agarose 2%, sachant que le fragment attendu et connu pour représenter l'ADN de *Wolbachia* a une taille de 438 pb (Werren et Windsor 2000) (Fig. A3.1).



**Fig. A3.1** Exemple de dépistage de *Wolbachia* chez *L. lili* sur gel d'agarose 2% teinté de bromure d'éthidium. Puits 1 à 8 = individus EuFR 1 à 8, puits 9 à 12 = individus EuSE 1 à 4, puits 13 et 14 = témoins positifs (*Nasonia* infecté par *Wolbachia*, Na +), puits 15 = témoin négatif (*Nasonia* non-infecté, Na -), puits 16 = H<sub>2</sub>O, puits 17 = échelle 100pb et puits 19 à 25 = individus AmNB 1 à 8. Les flèches vertes indiquent les fragments de 438pb, qui représentent l'amplification d'un fragment d'ADN de *Wolbachia*.

## Résultats

En Europe, 4 des 6 sites échantillonnés possèdent au moins un individu de *L. lili* infecté par *Wolbachia*, les taux d'infection étant très variables au sein de ces 4 sites. En effet, le taux d'infection varie de moins de 1% (EuCH) à un taux élevé de 75% (EuUK-1). En considérant les 60 individus dépistés en Europe, nous sommes en présence d'un taux d'infection moyen de 32% (Tableau A3.1).

En Amérique du Nord, le patron d'infection est tout autre. Parmi les 374 individus échantillonnés pour la présence de *Wolbachia*, un seul individu semble infecté (AmON-1). Cela se traduit par un taux d'infection de seulement ~0.3% chez les individus nord-américains (Tableau A3.1). De plus, nous avons des doutes par rapport à ce résultat puisque la bande observée chez le seul individu infecté était très pâle (résultat non présenté), quoiqu'elle fût

tout de même apparente les deux fois où nous avons testé l'individu. Il est possible que ce soit le résultat d'une erreur de manipulation (e.g., contamination d'un échantillon), cependant aucune contamination ne fut observée au niveau des deux témoins négatifs tout au long de cette expérience.

## Conclusion

Plusieurs études s'intéressant à la gamme d'espèces infectées par *Wolbachia* n'ont utilisé que quelques spécimens au sein d'une même espèce (Hilgenboecker *et al.* 2008). Ces résultats peuvent sous-estimer le taux d'infection et n'offrent pas d'informations détaillées sur le patron d'infection de cet endosymbiote chez une espèce.

Nos résultats préliminaires, en plus d'être la première mention de la présence *Wolbachia* chez *L. lili*, suggèrent un patron d'infection différentiel chez l'espèce envahissante entre son territoire d'origine en Europe et sa zone d'introduction en Amérique du Nord. Le taux d'infection en Europe, bien que très variable d'une région à l'autre, est relativement élevé. En Amérique du Nord, *L. lili* ne semble pas être infecté par *Wolbachia*, à l'exception d'un seul individu en Ontario (AmON-1). Il y a donc une différence nette entre les individus de l'aire native, ou naturalisée en Europe, et les individus de l'aire envahie en Amérique.

La perte d'infection par *Wolbachia* durant la colonisation d'espèces envahissantes a déjà été observée chez certaines espèces de fourmis (Shoemaker *et al.* 2000; Reuter *et al.* 2005; Rey *et al.* 2013). Cette différence de patron d'infection entre les populations natives/naturalisées et envahissantes peut être causée par des événements indépendants des épisodes d'introduction, mais cela est très peu probable. Il est plutôt admis que cette différence soit directement liée aux épisodes d'introduction via un des trois processus suivants (Reuter *et al.* 2005): (i) *Wolbachia* peut être éliminé des populations envahissantes par un effet fondateur si aucune des femelles introduites n'était infectée. Ce scénario est peu probable dans le cas de *L. lili*, car le taux d'infection dans le nord de l'Europe est relativement élevé et des

analyses de génétique des populations ont révélé que les populations envahissantes proviennent fort probablement de ces régions (voir chapitre 2); (ii) *Wolbachia* peut être éliminé par dérive génétique après avoir été introduit dans un nouvel habitat. Ce scénario est très plausible chez *L. lili* si *Wolbachia* cause de l'incompatibilité cytoplasmique (IC). En effet, il y a de fortes probabilités que l'infection au sein d'une population s'élimine par sélection si le nombre d'individus infectés diminue sous un certain seuil. Une forte dérive pendant et après l'introduction peut avoir réduit de façon stochastique le nombre d'individus infectés dans la population, ce qui aurait causé l'élimination de *Wolbachia*; (iii) *Wolbachia* peut être éliminé des populations envahissantes si l'infection est contre-sélectionnée dans le nouveau territoire, et ce même si le taux d'individus infectés était initialement relativement élevé. Le dépistage de *Wolbachia* chez *L. lili* et leurs routes d'invasion en Amérique du Nord (voir chapitre 2) suggèrent que ce sont probablement les scénarios (ii) ou (iii), lors du processus d'invasion, qui auraient causé l'élimination quasi totale de *Wolbachia* au sein des populations nord-américaines.

L'invasion du territoire nord-américain par le criocère du lis constitue donc une bonne opportunité pour étudier les phénomènes pouvant causer l'élimination de *Wolbachia*, ou tout autre parasite associé à la reproduction de l'hôte. De plus, nous sommes en présence d'un intéressant phénomène au Royaume-Uni (EuUK-1), puisque les individus de cette région sont fortement infectés par *Wolbachia*, alors que *L. lili* y aurait aussi été introduit. Il serait donc intéressant de comparer les événements d'introduction de *L. lili* en l'Amérique du Nord et au Royaume-Uni afin de savoir ce qui peut causer une différence aussi marquée du taux d'infection par *Wolbachia* dans deux territoires envahis.

## Références

Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, *et al.* (2008) How many species are infected with *Wolbachia*?—a statistical analysis of current data. *FEMS Microbiology Letters* 281:215-220

- Reuter M, Pedersen JS, Keller L (2005) Loss of *Wolbachia* infection during colonisation in the invasive Argentine ant *Linepithema humile*. *Heredity* 94:364-369
- Rey O, Estoup A, Facon B, *et al.* (2013) Distribution of endosymbiotic reproductive manipulators reflects invasion process and not reproductive system polymorphism in the little fire ant *Wasmannia auropunctata*. *PLOS ONE* 8:e58467
- Shoemaker DD, Ross KG, Keller L, *et al.* (2000) *Wolbachia* infections in native and introduced populations of fire ants (*Solenopsis spp.*). *Insect Molecular Biology* 9:661-673
- Werren JH, Baldo L, Clark ME (2008) *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology* 6:741-751
- Werren JH, Windsor D, Guo L (1995) Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 262:197-204
- Werren JH, Windsor DM (2000) *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 267:1277-1285

