

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Diversité du Vivant (ED 0392)

Présentée par

Mme TORRES-LEGUIZAMON Magally

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Etude Génétique de *Tecia Solanivora* (Povolny 1973)

Soutenance prévue le 04/02/2010

devant le jury composé de :

HIGUET Dominique	Professeur Université Paris VI	Président du Jury
SILVAIN Jean-François	Directeur de recherche IRD	Directeur de thèse
GIRAUD Tatiana	Directrice de recherche CNRS	Rapporteur
GUILLEMAUD Thomas	Chargé de recherche IRD	Rapporteur
SAMADI Sarah Examineurs	Chargé de recherche IRD	Rapporteur
DUPAS Stéphane	Chargé de recherche IRD	Encadrant de thèse



**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité
(Diversité du Vivant (ED 0392))

Présentée par

Mme TORRES-LEGUIZAMON Magally

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Etude Génétique de *Tecia Solanivora* (Povolny 1973)

Soutenance prévue le 04/02/2010

HIGUET Dominique	Professeur Université Paris VI	Président du Jury
SILVAIN Jean-François	Directeur de recherche IRD	Directeur de thèse
GIRAUD Tatiana	Directrice de recherche CNRS	Rapporteur
GUILLEMAUD Thomas	Chargé de recherche IRD	Rapporteur
SAMADI Sarah Examineurs	Chargé de recherche IRD	Rapporteur
DUPAS Stéphane	Chargé de recherche IRD	Encadrant de thèse

Université Pierre & Marie Curie - Paris 6
Bureau d'accueil, inscription des doctorants et base de données
Esc G, 2^{ème} étage
15 rue de l'école de médecine
75270-PARIS CEDEX 06

Tél. Secrétariat : 01 42 34 68 35
Fax : 01 42 34 68 40
Tél. pour les étudiants de A à EL : 01 42 34 69 54
Tél. pour les étudiants de EM à ME : 01 42 34 68 41
Tél. pour les étudiants de MF à Z : 01 42 34 68 51
E-mail : scolarite.doctorat@upmc.fr

A Maria la bandida

REMERCIEMENTS

Au moment d'écrire ces remerciements, mes pensées vont à plusieurs personnes. Tout d'abord les membres de mon jury : Thomas Guillemaud, Tatiana Giraud, Dominique Higuët et Sarah Samadi qui me font l'honneur d'évaluer mes travaux de thèse mais également à Jean François Silvain et Stéphane Dupas mon directeur de thèse et mon encadrant pour m'avoir accompagné pendant ces trois ans et quelques mois et pour m'avoir permis d'effectuer cette thèse au sein de l'équipe IRD. Merci à Jean-François pour sa patience, sa gentillesse, pour ses mots d'encouragements et son incroyable disponibilité malgré ses nombreuses occupations... Ah et merci de m'avoir poussé à écrire mon manuscrit en Français grâce à vous « si » sera désormais « oui ». Un grand merci à tout le monde d'avoir été aussi réactifs pendant l'écriture du manuscrit. Merci à Stéphane pour son aide. Je profite également de ces remerciements pour présenter mes excuses à Jean François et Stéphane que j'ai obligé à travailler pendant les fêtes...

Je remercie également très chaleureusement Madame Françoise Hostalier ainsi que Jean Claude Alt sans qui ma venue en France n'aurait pas été possible.

Merci aux membres de mon comité de thèse pour leurs commentaires m'ont fait avancer énormément.

Merci également à tous les membres du LEGS et plus particulièrement à son directeur Pierre Capy. J'ai vraiment passé de très bons moments au sein du laboratoire. J'y ai trouvé une ambiance scientifique et humaine très ouverte ainsi que des personnes très disponibles et toujours prêtes à discuter.

Je remercie également Florence Mougel-Imbert, Dominique Vautrin et bien sûr Michel Solignac. Grâce à vous j'ai appris quantité de choses ainsi bien au niveau scientifique qu'humain. Merci pour tout le soutien apporté qui m'a été d'une grande aide...

Je remercie tous les membres et ex-membres de l'équipe IRD qui m'ont accompagné pendant ces années... Je ne vous remercie pas un par un car ma thèse est déjà TROP longue et vous êtes nombreux. Merci d'avoir été si sympathiques et gentils avec moi durant ces trois années. Je vous remercie de votre accueil chaleureux de votre amabilité, de votre disponibilité de votre aide et de votre patience envers moi.

Encore une fois je ne peux pas faire une liste exhaustive, mais je remercie tout ceux et toutes celles ce qui ont corrigé l'orthographe, les tournures de phrase, la grammaire et tous les « PETITS » détails de la langue française de mon manuscrit... Oh la la ! Votre langue est très difficile !!!!! Merci sans vous, même les membres du jury n'auraient rien compris!!!

J'ai une pensée spéciale pour Isabellitis Merlin (bientôt Bussi). Tu as vu les jolies cartes de ma thèse? Merci de ton aide inconditionnelle. Je remercie aussi les «francesitas de la fac » soso, julieta souvuthy et Ludy qui étaient là pour me donner leurs cours et m'expliquer comment me retrouver dans les méandres de Jussieu.

Je voudrais remercier spécialement les gens qui m'ont aidé de façon désintéressée avec l'échantillonnage. Désolé pour vous ! Pour une fois dans ma thèse je peux écrire en espagnol... Alors je me lâche : Muchisimas gracias a Danilo (Guatemala) ,Yannery (Costa Rica), Laura y Antonio, (Venezuela) Aurelio y Angeles (Iles Canaries)... muchas gracias por todo. Quiero que sepan que las puertas de mi casa estan abiertas para ustedes cuando quieran ... de hecho cuando vienen a visitarme a Francia ???... Gracias tambien a Olivier, por haberme capturado las polillitas en (Equateur).

Agradezco tambien ami profesora Carmen Helena Moreno que me enseñó a amar la genética, a mis amigos: mi querido orren, mi flaco Jesús David, a Blanquita y su familia, a Dendrita, Heidicilla y a Vonchis; Porque se que ha pesar de la distancia puedo contar con ustedes. Gracias a mi Dorita adorada y a su familia (princesa todos los días de mi vida agradezco que seas mi amiga. Mi amorrrrrr por fin acabe de escribir la enciclopedia!!!).

Agradezco especialmente a mi enorme familia, mis abuelitos mis tios, mis primos, a mi mamita querida y sus rosarios, a mi papi que me recuerda siempre que soy capaz de lograr las cosas que quiero, a Murmur, mi mama en Francia, por su apoyo incondicional, merci a toi aussi Claude. A mis hermanas PaoPao, negra eres la hermana que cualquier ser humano podria desear y a Véve, tu sais que je t'aime très très très fort? Merci a mon comité de soutien en France: Linu, Martu, Helgu... como siempre les digo niñas, gracias por escucharme y por haberme adoptado.

Mis agradecimientos se terminan por mi querido esposito Bertrand Guenet Torres Leguizamon... uhy pajarito I don't know que habria hecho sans toi... merci, gracias, thanks!!!! Eres el regalito que dios me dio pour être sage!!!, espero que tus dias a mi lado sean tan felices y llenos de amor como son los mios al tuyo... je voudrais aussi remercier toute ta famille si accueillante et gentille... spécialement tes parents et ton frere... Joli papa... tengo una tarea en español para que le traduzcas a Beatriz y a Rémi... muchas gracias por quererme y por darme su apoyo incondicional, gracias por acogerme en su familia como un miembro mas... ustedes tambien son mi familia (a si mi apellido no sea Guenet), je suis vraiment touchée!!!

Bref, heureusement c'est la fin... merci a tout le monde!!!! y muchos besos...

TABLES DES MATIERES

RESUME	11
ABSTRACT.....	12
INTRODUCTION :	13
ESPÈCES INVASIVES ET INVASIONS BIOLOGIQUES	13
1. Une définition qui fait débat.....	13
2. L’outil génétique pour étudier et caractériser les invasions biologiques	15
3. Le modèle d’étude et sa plante hôte.....	17
3.1. Le modèle.....	17
3.2. La plante hôte.....	18
4. Historique de l’invasion de <i>T. Solanivora</i>	21
5. Objectifs de la thèse	26
MATÉRIELS ET MÉTHODES :	27
ASPECTS GÉNÉRAUX	27
1. L’échantillonnage.....	27
2. Les gènes mitochondriaux	31
3. Les microsatellites.....	32
CHAPITRE I:	35
UTILISATION D’UN MARQUEUR MITOCHONDRIAL POUR DÉTERMINER L’AIRE D’ORIGINE DE <i>TECIA</i>	
<i>SOLANIVORA</i> ET RETRACER SES ROUTES D’INVASION	35
GENETIC BOTTLENECK IN INVASIVE SPECIES: THE POTATO TUBER MOTH ADDS TO THE LIST.....	45
<i>Introduction.</i>	46
<i>Materials and methods</i>	49
Sampling protocol	49
DNA analysis.....	50
Literature review on the genetics of invasions	50
<i>Results</i>	51
Genetic variability	51
Literature review on the genetics of invasions	51

<i>Discussion</i>	53
Genetic differences between native and introduced populations of <i>T. solanivora</i>	53
Prevalence of genetic bottlenecks in invasive species	53
Genetic bottlenecks and invasion success.....	54
<i>Acknowledgements</i>	56
<i>Figures legends</i>	57
<i>Figures</i>	58
<i>Tables</i>	60
INFERRING NATIVE RANGE AND INVASION SCENARIOS WITH MITOCHONDRIAL DNA: THE CASE OF <i>T.</i>	
<i>SOLANIVORA</i> SUCCESSIVE STEPPING-STONE INTRODUCTIONS IN CENTRAL AND SOUTH AMERICA.....	65
<i>Introduction</i>	66
<i>Materials and methods</i>	69
Bibliographic historical research.....	69
Collection of samples and study sites	69
DNA extraction and amplification	70
Data analyses	71
<i>Results</i>	73
Genetic Diversity.....	73
Population genetic structure	73
Historical demography	75
<i>Discussion</i>	76
Limits of <i>T. solanivora</i> native range	76
<i>T. solanivora</i> population structure in its native range.....	77
Genetic inferences on the colonization process.....	78
<i>Acknowledgements</i>	80
<i>Figure</i>	81
<i>Tables</i>	82
CHAPITRE II:	89
MISE AU POINT DE MARQUEURS MICROSATELLITES CHEZ <i>TECIA SOLANIVORA</i> :	89
PROBLÈMES LIÉS AU DÉVELOPPEMENT DE LOCUS MICROSATELLITES CHEZ LES LÉPIDOPTÈRES	89
1. <i>Dynamique évolutive de microsatellites chez les Lépidoptères</i>	91

2. Développement de marqueurs microsatellites chez <i>T. solanivora</i>	92
ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF POLYMORPHIC MICROSATELLITES IN THE POTATO TUBER	
MOTH <i>TECIA</i>	95
<i>SOLANIVORA</i> (POVOLNY, 1973) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE)	95
<i>Main Text</i>	96
<i>Acknowledgements</i>	100
<i>Table legend</i>	101
CHAPITRE III:	103
UTILISATION DES MARQUEURS MICROSATELLITES POUR RETRACER LES ROUTES D'INVASION DE <i>TECIA</i>	
<i>SOLANIVORA</i>	103
RECONSTITUTION OF <i>TECIA SOLANIVORA</i> INVASION HISTORY: GENETIC INFERENCE CONFRONTED TO	
HISTORICAL DATA.	109
<i>Introduction</i>	110
Hypothetical scenario of introduction.....	112
<i>Materials and methods</i>	113
Collection of samples and study sites	113
DNA extraction and amplification	113
Statistical analyses.....	114
<i>Results</i>	117
Genetic variation along the invasion process	117
ABC computations comparison of scenarios introduction	119
<i>Discussion</i>	120
Genetic variation along the invasion process	120
Comparison of invasion scenarios and parameters estimation using Bayesian approach	122
<i>Figures</i>	125
<i>Tables</i>	131
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	135
<i>La génétique des populations et les invasions biologiques</i>	135
<i>Délimitation de la zone d'origine de Tecia Solanivora</i>	136
Limite sud de la zone d'origine	137

Limite nord de la zone d'origine	138
<i>Les routes d'invasion :</i>	142
Données historiques de l'invasion de <i>Tecia solanivora</i>	142
Scénario hypothétique initial établi à partir de la littérature.....	142
<i>Confirmation ou infirmation des données historiques, les enseignements de l'étude génétique des populations :</i>	144
Introduction d'individus du Guatemala vers le Costa Rica : confirmation des données historiques.....	144
Introduction d'individus du Costa Rica vers le Venezuela : confirmation des données historiques.....	145
Invasion de la Colombie, de l'Equateur et des Iles Canaries : infirmation des données historiques.....	145
<i>Variation de la diversité génétique au cours du processus d'invasion</i>	147
Zone d'origine (Guatemala)	147
Zone envahie.....	148
<i>Conclusion générale</i>	151
<i>Perspectives</i>	153
BIBLIOGRAPHIE	157
ANNEXES	183
<i>Annexe n°1</i>	184
<i>Protocole pour l'échantillonnage d'individus adultes de Tecia solanivora</i>	184
<i>Protocolo para la recolección de individuos adultos de Tecia solanivora.</i>	186

RESUME

Tecia solanivora est un lépidoptère de la famille des Gelechiidae dont la chenille parasite les tubercules de la pomme de terre, *Solanum tuberosum*. *T. solanivora* est considérée comme une espèce invasive d'important impact économique. Elle est présente en Amérique Centrale et du Sud, mais également aux Iles Canaries. Des données historiques existent et ont permis d'élaborer des hypothèses relatives à son aire d'origine et à ses routes d'invasions. *T. solanivora* serait originaire d'Amérique Centrale et se serait propagée au Venezuela *via* des importations de semences puis aurait envahi l'Amérique du Sud de proche en proche. Les populations des Iles Canaries pourraient être issues d'une importation illégale en provenance du Venezuela. Les objectifs de cette thèse étaient d'utiliser des outils et des concepts de génétique des populations afin de (i) définir précisément l'aire d'origine de l'espèce, (ii) de proposer un scénario d'invasion de l'espèce (iii) estimer les changements intervenus dans la diversité génétique de l'espèce tout au long du processus invasif et enfin, (iv) de confronter les données génétiques obtenues aux données historiques compilées. Pour répondre à ces objectifs nous avons échantillonné des populations au Guatemala, Costa Rica, Venezuela, Colombie, Equateur et aux Iles Canaries. Dans un premier temps, nous avons utilisé un marqueur mitochondrial correspondant à une séquence partielle du gène codant pour le Cytochrome *b*. Cependant, plusieurs études ayant montré une réduction très importante de la variabilité génétique des populations invasives au niveau des marqueurs mitochondriaux, nous avons décidé de développer des marqueurs microsatellites. En dépit de la difficulté de développer et d'utiliser des marqueurs microsatellites chez les Lépidoptères, nous avons obtenu 9 locus à l'équilibre d'Hardy-Weinberg et sans allèles nuls. La forte variabilité génétique au sein du marqueur « cyt *b* » dans les populations du Guatemala comparativement aux autres, notamment en Amérique centrale, confirme que le Guatemala est bien la zone d'origine de l'espèce. L'utilisation des marqueurs nucléaires et mitochondrial a permis de caractériser une réduction de la diversité génétique de l'espèce lors du processus invasif. L'utilisation d'analyses bayésiennes novatrices a permis de comparer différents scénarii d'introduction de l'espèce. Ces analyses, ainsi que des analyses statistiques classiques, contredisent partiellement le scénario d'invasion établi initialement à partir des données historiques. Consécutivement, nous faisons l'hypothèse dans cette thèse que *T. solanivora* a d'abord envahi le Costa Rica à partir de populations du Guatemala, puis, que des événements d'introductions indépendants et successifs à partir du Costa Rica ont été à l'origine de l'invasion du Venezuela, de la Colombie, de l'Equateur et des Iles Canaries. Notre étude montre que l'utilisation conjointe de différents types de marqueurs moléculaires et de nouvelles approches analytiques permet de tester, préciser et, éventuellement contredire, des scénarios d'invasion basés sur le seul recueil de données évènementielles.

ABSTRACT

Tecia solanivora is a Lepidoptera of the family Gelechiidae. The larvae feed on tubers of potato *Solanum tuberosum*. *T. solanivora* is considered an invasive species of major economic impact in Central and South America as well as in Canary Islands. Thanks to historical data, several assumptions have been proposed about the area of origin of the species and its invasion pattern. *T. solanivora* may be native from Central America and may have invaded Venezuela because of importation of contaminated seeds. Then, the species may have invaded South America step by step. Finally populations of Canary Islands may come from illegal seed importation from Venezuela. The objectives of the thesis were (i) to define more precisely the area of origin of the species, (ii) to propose an invasion scenario, (iii) to characterize changes in species genetic diversity during the invasive process and finally (iv) to compare the historical data with the genetic data we obtained. First, we sampled populations from Guatemala, Costa Rica, Venezuela, Ecuador and Canary Island. Then we used a mitochondrial marker corresponding to a partial sequence of the Cytochrome *b* gene. However, several studies having reported an important decrease in the genetic diversity of mitochondrial markers for invasive populations, we decided to develop microsatellites markers. Despite the high difficulties to develop and use microsatellite for Lepidoptera, we succeeded to obtain 9 loci at the Hardy Weinberg equilibrium and without null alleles. The high level of genetic diversity observed for the mitochondrial marker in populations from Guatemala compared with the other country of Central America analysed suggests that this country is likely the area of origin of *T. solanivora*. Nuclear and mitochondrial markers indicate a strong reduction of genetic diversity during the invasive process. Finally, thanks to Bayesian analyses we compared different introduction' scenarios. These analyses as well as classical statistics analyses contradict the invasion pattern developed from the historical data. In this study we proposed that *T. solanivora* has first invaded Costa Rica from populations of Guatemala. Then, independent and successive introduction events led to the invasion of Venezuela, Colombia, Ecuador and Canary Islands. Our study demonstrates that the combined use of different kind of molecular markers and recently developed analytical methods can test, clarify and eventually challenge invasion scenarios solely based on historical data.

Introduction :

Espèces invasives et invasions biologiques

1. Une définition qui fait débat

Plusieurs termes sont couramment utilisés pour désigner les espèces invasives dans la littérature (Davis & Thompson 2000; Colautti & MacIsaac 2004; Colautti & Richardson 2009), les plus typiquement utilisés étant : espèces exotiques (Green 1997; Kolar & Lodge 2001, Sax *et al.* 2007), espèces étrangères (Crawley *et al.* 1996), espèces non-indigènes (Mack *et al.* 2000; Pimentel *et al.* 2000), espèces introduites (Lonsdale 1994), espèces importées (Williamson & Fitter 1996), espèces colonisatrices (Williamson 1996), espèces non-autochtones (Davis *et al.* 2000), espèces immigrantes (Bazzaz 1986), espèces naturalisées (Richardson *et al.* 2000) et d'autres encore. Cet éventail de termes est-il symptomatique du désaccord qui accompagne la définition même d'espèce invasive ou bien est-il le reflet de situations biologiques finement nuancées, voire fondamentalement différentes ?

En dernière analyse, les principaux désaccords semblent dus essentiellement à l'inclusion ou à l'exclusion de trois critères principaux dans les définitions proposées.

- Un critère géographique : certains auteurs considèrent que les espèces doivent surmonter (avec ou sans intervention humaine) une barrière géographique importante, et même franchir une grande distance pour être considérées

comme invasives (Richardson *et al.* 2000; Pysek & Richardson 2006), alors que d'autres auteurs admettent comme invasive une espèce qui étend simplement son aire de répartition de proche en proche, sans réellement franchir de barrière (Thompson *et al.* 1995; Davis & Thompson 2000).

- Un critère d'impact, dommageable ou non, de l'espèce invasive sur l'habitat colonisé (Pejchar & Mooney 2009). Cette notion (impact) est assez floue car elle dépend de nombreux facteurs propres aux espèces, aux écosystèmes et aux relations entre les deux. Elle est également subjective, à la fois dans le choix des variables mesurées (incidence sur la richesse spécifique, pertes économiques occasionnées, etc.) et dans leur pondération dans l'analyse des résultats empiriques (Richardson *et al.* 2000; Rejmanek 2002; Colautti & Richardson 2009).
- Enfin, le critère d'expansion démographique, qui est lié à un critère d'établissement avéré. Plusieurs définitions prennent en compte le fait que les espèces invasives deviennent localement abondantes. Cependant le fait de présenter une expansion démographique notable n'est pas en soi suffisant pour garantir l'établissement de populations à la fois pérennes et autonomes.

Malgré l'existence d'un débat, une majorité de scientifiques partage l'opinion qu'une invasion biologique est avérée quand une espèce établit, hors de son aire de répartition initiale, une ou plusieurs populations pérennes et autonomes dans les milieux investis, autrement dit lorsqu'elle s'y reproduit sans apports extérieurs. Shea & Chesson (2002) ajoutent à cette définition la nuance que les invasions biologiques représentent une association nouvelle entre un environnement et une espèce. Cette association est due soit simplement à un événement d'introduction mettant en contact une espèce et un écosystème

(éventuellement déjà pré-adaptés l'un à l'autre), soit à un changement environnemental, soit à un changement génétique dans l'espèce, soit à une combinaison de ces trois facteurs (Facon *et al.* 2006). Autrement dit, s'il n'y a pas « coup de foudre », un arrangement à l'amiable est toujours possible.

2. L'outil génétique pour étudier et caractériser les invasions biologiques

Une des approches utilisées pour mieux comprendre les invasions biologiques est l'utilisation des concepts et de la génétique des populations et des outils moléculaires qui ont été développées dans ce cadre (Estoup *et al.* 2004). Plusieurs études cherchent à identifier la ou les zones d'origine des populations invasives, et lorsqu'elles y sont parvenues, à caractériser le profil génétique des populations sources. Les altérations de la variabilité génétique, fréquentes chez les espèces envahissantes au cours du processus de colonisation ou lors de l'établissement final, sont aussi l'objet d'études récurrentes (Sakai *et al.* 2001; Wares *et al.* 2005; Dlugosch & Parker 2008; Puillandre *et al.* 2008; Ciosi *et al.* 2008).

L'identification des populations sources répond à la fois à des questions d'ordre appliqué et fondamental. Elle peut notamment servir à améliorer l'efficacité des programmes de lutte biologique dans la zone envahie via, par exemple, l'inventaire des antagonistes, (tels que des insectes entomophages ou des virus) qui régulent les populations de l'espèce envahissante dans l'aire d'origine. Mieux encore, une bonne connaissance des populations sources peut servir à l'identification des stades de développement durant lesquels l'espèce est plus sensible aux agents pathogènes ou aux parasitoïdes (Roderick & Navajas 2003; Baliraine *et al.* 2004; Cognato *et al.* 2005).

Les espèces exotiques peuvent être utilisées également pour évaluer la précision relative de modèles climatiques sur les projections géographiques des distributions futures attendues. Notamment, la définition de la niche éco-climatique de l'insecte dans sa zone d'origine peut permettre de prévoir quelle sera l'étendue de sa distribution dans la zone envahie, compte tenu des caractéristiques du climat local actuel ou futur (Sax *et al.* 2007). Circonscrire l'aire d'origine des espèces invasives peut aussi contribuer à caractériser les attributs phénotypiques supposés qui découlent de changements évolutifs liés à l'introduction ou au succès invasif (Ahern *et al.* 2009). Dans le même ordre d'idées, (Kolbe *et al.* 2004) soutiennent que l'identification de la population source d'une introduction est importante car elle réduit la probabilité de faire des inférences erronées sur la nature et l'ampleur des changements évolutifs au cours des introductions et des invasions.

Il n'est donc pas étonnant que les populations invasives suscitent un vif intérêt car qu'elles permettent de fournir en « temps réel » un aperçu sur divers processus écologiques et évolutifs (Sax *et al.* 2007). L'un des intérêts, et non des moindres, est de quantifier ces processus, souvent difficiles à étudier dans des populations autochtones. Ces processus sont souvent en liaison avec les variations soudaines du régime alimentaire d'une espèce (accompagnant le saut d'une plante hôte native à une plante cultivée) ou bien avec des changements brusques de la constitution génétique des populations (dans le cas des goulots d'étranglement). Ces changements rapides se font *in situ* à des échelles temporelles courtes (Sax *et al.* 2007).

3. Le modèle d'étude et sa plante hôte

3.1. Le modèle

Tecia solanivora est un lépidoptère de la famille des Gelechiidae. Elle est couramment connue sous les noms vernaculaires de mite centre américaine de la pomme de terre ou mite Guatémaltèque (EPPO 2006). Le développement de l'insecte passe par une métamorphose complète (holométabole) qui comprend quatre étapes: œuf, larve, nymphe et adulte (Fig. 1). L'état larvaire présente 4 stades (Fig. 1b). La durée de chacune des étapes du développement est fortement corrélée aux conditions environnementales, en particulier la température (Torres 1989; Notz 1996; Dangles *et al.* 2008) et l'humidité (Le Roux 1993).

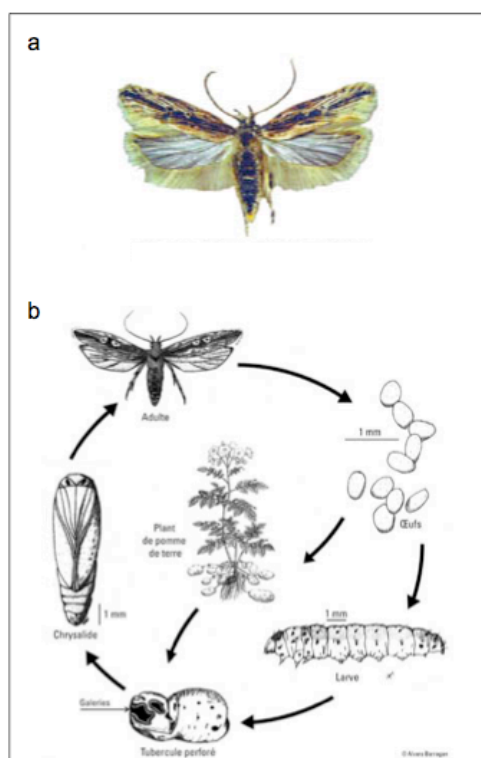


Figure 1 : Individu adulte de *T. solanivora* (a) et cycle de vie de *T. solanivora* (b).

Source IRD

Dangles *et al.* (2008) ont étudié la tolérance thermique de *T. solanivora* dans un gradient compris entre 10° C et 20° C. L'étude a montré que le taux net de reproduction de l'espèce augmente avec la température. L'optimum de développement se situe à 15° C ; le même résultat avait été obtenu antérieurement par Notz (1996). Les deux études notent qu'il n'y a pas de développement au-dessous de 10° C.

L'évolution totale de l'œuf à l'adulte, a une durée moyenne de 42 jours à 25° C et de 95 jours à 15,5° C. Le nombre de générations par an varie de 2 à 10 pour une étendue de température de 10 à 25° C en conditions expérimentales (Torres 1989; Notz 1996; Álvarez & Trillos, 1999).

3.2. La plante hôte

T. solanivora est exclusivement inféodé à *Solanum tuberosum* ; elle attaque uniquement le tubercule en champs (Fig. 2) et en stockage (Fig. 3). Les adultes pondent les œufs dans la partie végétative de la plante; une fois les œufs éclos, les larves excavent la terre et gagnent le tubercule où l'insecte creuse de galeries qui l'endommagent irrémédiablement (Fig. 4).



Figure 2 : Transect de prélèvement dans un champ de pommes de terre au Guatemala.



Figure 3 : Stock de pommes de terre au Guatemala.



Figure 4 : exemple de ravage de *T. solanivora* sur les tubercules de pomme de terre.

La pomme de terre cultivée a un unique centre d'origine : le Pérou (Fig. 5). Les Incas la cultivaient, près de 1 000 ans avant J.C. De cette région, la culture de la pomme de terre s'est d'abord élargie au Nord du Chili, au Nord Ouest de l'Argentine et au Sud de l'Equateur. Par la suite, elle a été cultivée dans le reste de l'Amérique du sud, notamment en Colombie et Venezuela (Hijmans & Spooner 2001).



Figure 5 : Carte de l'origine de *S. tuberosum*

Étant donné l'origine Sud-Américaine de la pomme de terre et l'origine supposée de *T. solanivora* en Amérique centrale-Guatemala, l'espèce a dû antérieurement être associée à une Solanaceae sauvage, vraisemblablement productrice de tubercules, présente au Guatemala.

L'un des noms vernaculaires de *T. solanivora* «polilla guatemalteca» ou mite guatémaltèque suggère que le Guatemala appartient à la zone d'origine de l'espèce. Celle-ci n'a pas été signalée au nord du Guatemala (notamment au Mexique); cependant elle peut théoriquement y être présente en raison du continuum écologique existant entre les reliefs de ces deux pays. Le statut d'espèce autochtone ou invasive de *T. Solanivora* dans les pays d'Amérique Centrale au sud du Guatemala est incertain car les données disponibles ne permettent pas de préciser la limite sud de l'aire d'origine de l'espèce.

La dispersion naturelle de *T. solanivora* de l'Amérique centrale à la zone Nord Andine de l'Amérique du Sud est peu probable. En effet, d'importantes barrières géographiques - telles que le canal de Panama ou la forêt vierge qui s'étend entre le Panama et la Colombie - ont pu empêcher sa propagation vers le continent Sud Américain.

4. Historique de l'invasion de *T. Solanivora*

Du fait de la nature des dommages qu'elle occasionne aux tubercules de pomme de terre et de son incidence économique, *T. solanivora* est une espèce facile à détecter. On dispose donc des éléments factuels concernant l'histoire de son expansion géographique au cours des 40 dernières années (Fig 6).

T. solanivora, ou du moins une espèce de teigne de la pomme de terre présentant les caractéristiques écologiques de l'insecte qui sera décrit ultérieurement sous ce nom, a été signalée pour la première fois au Guatemala en 1956 (Gómez 2008; Niño 2004) par le Service

de Coopération Inter Américaine pour le Développement Agricole (SCIDA). Ce service avait reçu pour mission d'améliorer la culture de la pomme de terre dans les pays de Centre Amérique. À cette date, les membres du SCIDA avaient observé au Guatemala des dégâts causés par un petit lépidoptère dans les cultures de pomme de terre (Torres 2003).

Entre 1958 et 1962 le gouvernement guatémaltèque a créé une Agence nationale pour le contrôle et la certification des semences de pomme de terre. Cette agence a eu pour mission d'améliorer la production locale de pomme de terre. Consécutivement entre 1957 et 1968 la plupart de semences certifiées produites dans une des régions du Guatemala (Quetzaltenango) ont été exportées vers les pays d'Amérique centrale, principalement au Honduras et au Costa Rica (Cifuentes 1980; Christiansen 1980).

Grâce à la mise en œuvre de ces nouvelles pratiques agronomiques, la production de pommes de terre au Guatemala a augmenté considérablement dans les années 70. Par conséquent l'essentiel de la production du pays a été exportée vers les pays d'Amérique centrale. La partie exportée a représenté 60 % à 90 % de la production totale en 1970 et 1971 (ICTA 1977).

C'est également dans les années 70 que la présence d'une teigne de la pomme de terre a commencé à être signalée dans quelques pays d'Amérique centrale. En 1970, la presque totalité des cultures de pommes de terre ont été détruites au Costa Rica (Murillo 1980). Au cours de la même période, l'espèce a été responsable du 20% de pertes dans les récoltes au Panama.

En 1973 *T. solanivora* a été décrite à partir des adultes et des larves collectées au Costa Rica (Povolny 1973).

Si l'on fait l'hypothèse que le Guatemala constitue la zone d'origine, ou tout au moins est inclus dans la zone d'origine de l'espèce, il est possible que l'augmentation des

exportations commerciales de pommes de terre du Guatemala vers les pays d'Amérique centrale ait été responsable de l'expansion des populations de *T. solanivora* dans ces pays au cours des années 70.

En 1982 l'espèce a été observée au Honduras où elle a infecté 350 ha et en 1989 le ravageur a été signalé au Nicaragua (Leal 1989). La présence de l'insecte n'a pas été signalée au Salvador, au Mexique ou en République Dominicaine (Murillo 1982).

Également dans les années 80, d'importants dommages aux cultures de pomme de terre ont été signalés au Guatemala (Ruano *et al.* 1984). L'expansion démographique du lépidoptère dans son aire supposée d'origine a été corrélée à la mise en place de systèmes d'irrigation des champs de pomme de terre. En effet il semble que le nouveau système d'irrigation ait permis une culture de la pomme de terre plus intensive tout au long de l'année. Il en est résulté une altération de la régulation démographique de l'espèce pendant la période sèche (Dardon comm. Pers.). Néanmoins les dégâts occasionnés par le ravageur au Guatemala n'étaient pas aussi importants que ceux qui ont été signalés dans les autres pays à la même période. Il est possible que la présence d'ennemis naturels ait pu, en partie, contrôler les ravages occasionnés par l'espèce dans ce pays (Giron 1984).

T. solanivora arrive au Venezuela à la fin de 1983, suite à l'importation de semences infectées en provenance du Costa Rica (Salazar & Escalante 1984; Torres 2003; Niño 2004). En 1985, l'espèce a atteint la zone frontalière entre le Venezuela et la Colombie; elle a ensuite colonisé les régions du centre et du sud du pays (Rincon & Lopez-Avila 2004). En 1996 *T. solanivora* a été signalée en Équateur dans une zone voisine de la Colombie (Gallegos *et al.* 1997). Enfin, en 1999, la présence de l'espèce est avérée dans les Iles Canaries (Nino 2004), faisant suite à l'importation illégale d'un sac de pommes de terre infestées provenant a priori d'Amérique du Sud (EPPO 2006). Aucune information précise n'est disponible sur l'origine

géographique des populations qui sont arrivées aux Iles Canaries, mais il est possible que l'espèce ait été introduite illégalement du Venezuela, de la Colombie ou de l'Équateur.

L'espèce n'est pas connue au Pérou. En effet, la présence de zones de basse altitude au sud de l'Équateur (qui ne sont pas favorables à la culture de la pomme de terre) (Fig 7), peut constituer une barrière écologique à la diffusion de l'espèce. En outre la mise en place d'une réglementation contrôlant les échanges de pomme de terre entre les deux pays et l'existence d'un système de surveillance dans la zone frontalière a empêché la dispersion de *T. solanivora* vers le sud du continent américain.

L'invasion de *T. solanivora* en cette zone est accompagnée aujourd'hui par la montée de l'incidence économique de deux autres espèces de Gelechiidae: *Symmetrischema tangolias* et *Phthorimaea operculella*. Dangles *et al.* (2009) ont montré que les trois ravageurs ensemble provoquent plus de dommage à la culture de la pomme de terre que ce qui est prédit par l'effet de chaque parasite seul en augmentant la biomasse des chrysalides et la fécondité des espèces.

T. solanivora est donc maintenant considérée comme un des plus important ravageur des cultures de pomme de terre en champs et en stockage dans les pays où elle est présente (EPPO 2006). Les étapes de l'invasion de *T. solanivora* ont été relativement bien décrites et l'expansion de l'insecte a été rapide. Ces circonstances font de l'espèce un bon modèle pour étudier les liens entre les événements génétiques et démographiques qui sont en oeuvre au cours des invasions biologiques.



Figure 6 : Historique de l'invasion de *T. solanivora*.

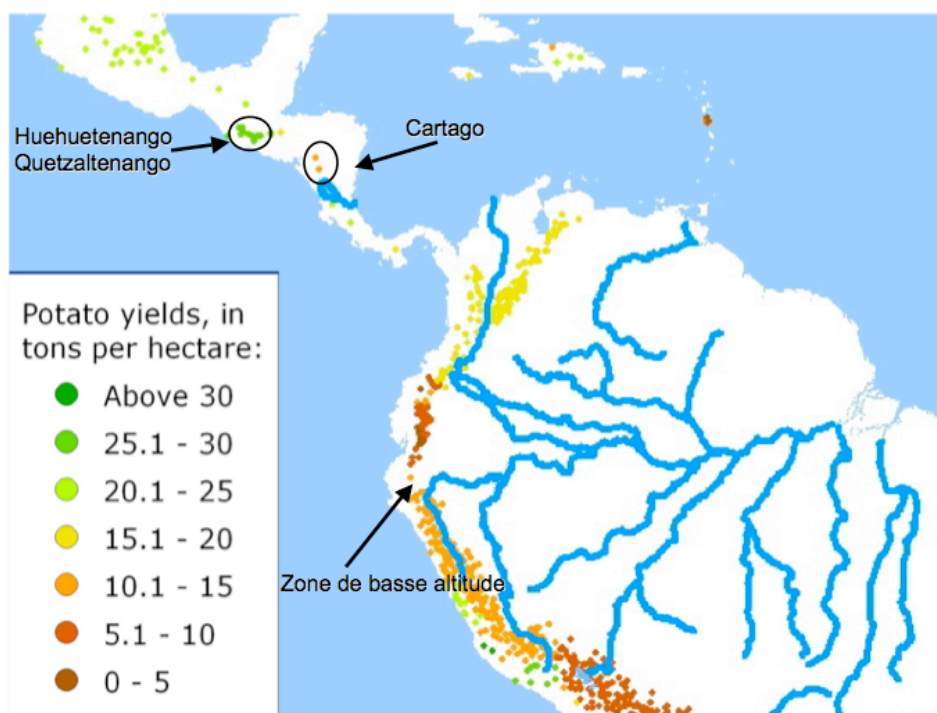


Figure 7 : Carte de production de la pomme de terre en Amerique central et du Sud.

Source : CIP

5. Objectifs de la thèse

Dans ce contexte, cette thèse avait pour objectifs : (i) de définir, à l'aide de marqueurs moléculaires, l'aire d'origine de *T. solanivora* ; (ii) de retracer, grâce à ces mêmes marqueurs, les routes d'invasion de l'espèce, (iii) estimer les changements intervenus dans la diversité génétique de l'espèce tout au long du processus invasif et enfin, (iv) de confronter les données génétiques obtenues aux données historiques compilées. A partir de ce constat, nous avons cherché à estimer les paramètres démographiques au cours de l'invasion, comme la présence et l'amplitude d'un ou plusieurs goulots d'étranglement subis par l'espèce au cours du processus invasif.

Matériels et Méthodes :

Aspects généraux

1. L'échantillonnage

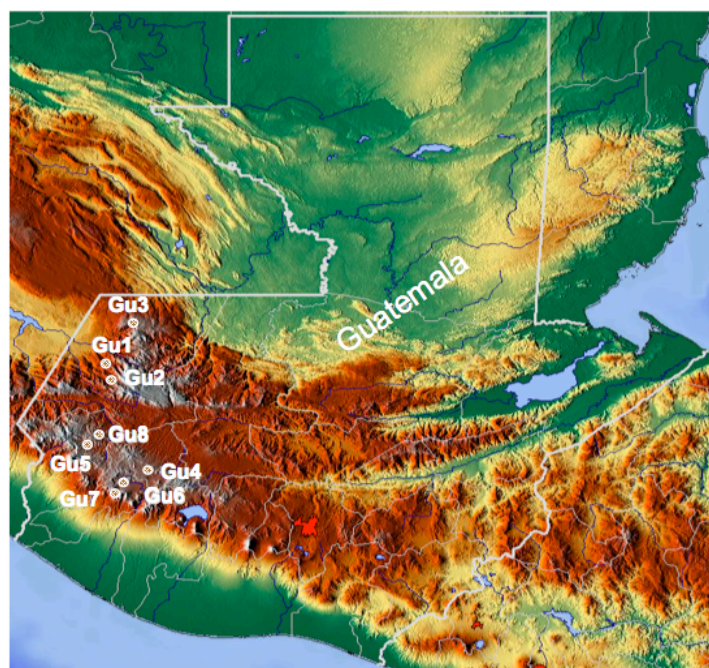
Une des grandes difficultés des études sur les espèces tropicales est leur échantillonnage, du fait de leur présence dans des régions souvent difficiles d'accès (végétation dense, humidité, altitude, etc.) et éventuellement de la situation politique de certains pays. Nous avons établi au cours de cette thèse un réseau de collaborations avec des représentants des institutions agronomiques gouvernementales tout au long de l'aire de répartition de *T. solanivora* : l'ICTA au Guatemala, l'INTA au Costa Rica, l'INIA au Venezuela et l'ICIA aux Iles Canaries. Grâce à ce réseau de collaborateurs, nous avons pu nous procurer des échantillons dans chacun des pays selon un protocole standardisé élaboré par nos soins (annexe1). Cette standardisation du protocole nous a permis non seulement de capturer des populations représentatives de l'espèce, mais encore de disposer d'échantillons de taille acceptable pour des analyses de génétique de populations.

Brièvement, le protocole consistait à placer de 3 pièges à eau appâtés avec la phéromone spécifique de l'espèce (Fig. 1) aux trois sommets d'un triangle équilatéral de 1000 m de côté.

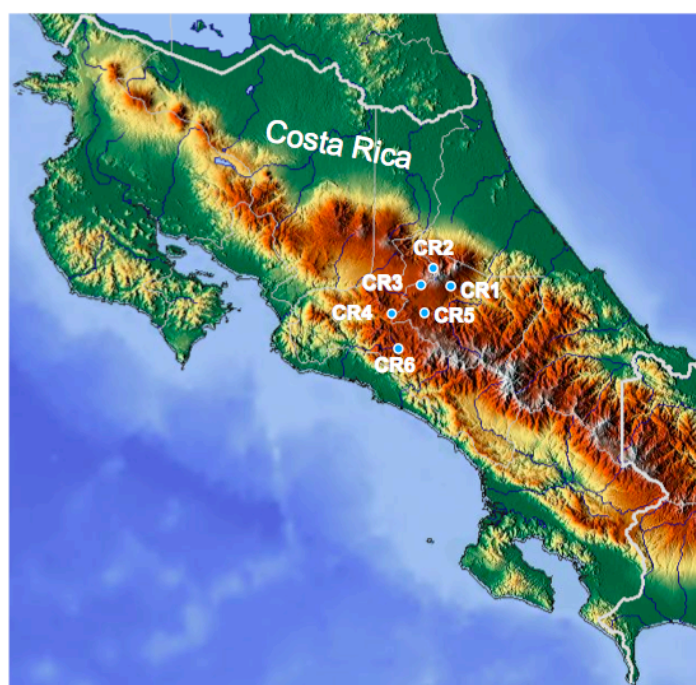


Figure 1 : Exemple de pièges à phéromones

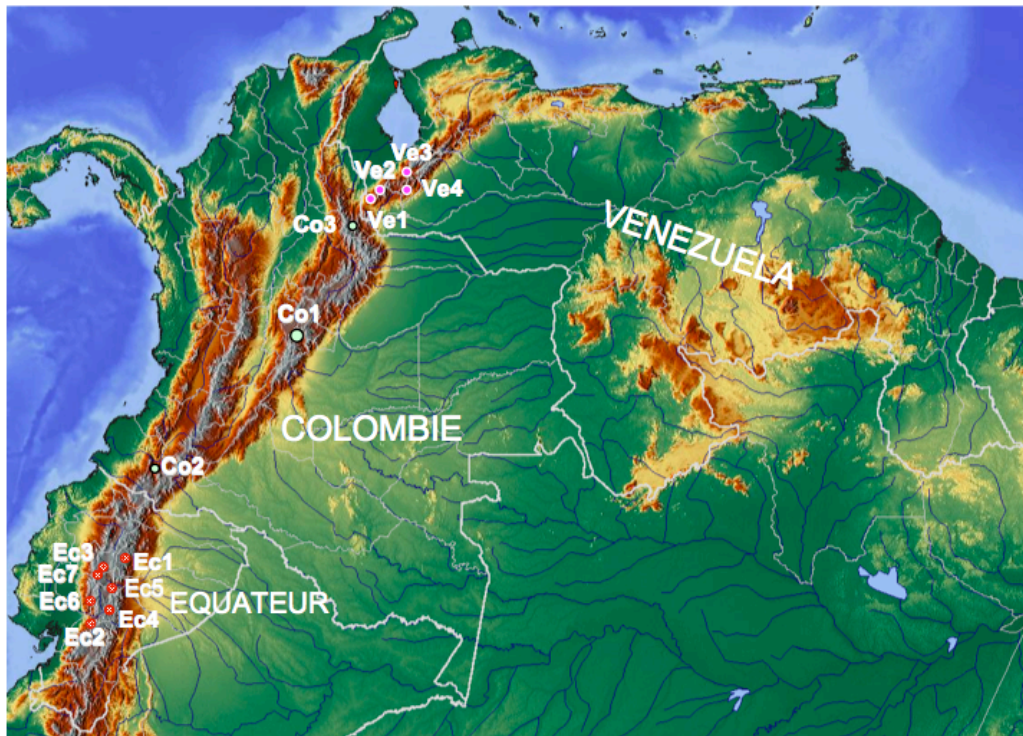
La carte des pays et populations échantillonnées est donnée dans la figure 2.



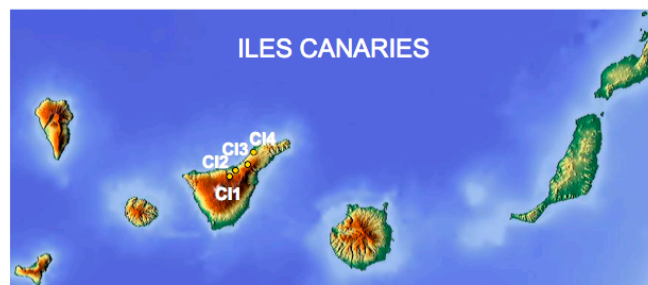
(A) Guatemala



(B) Costa Rica



(C) Venezuela, Colombie, Equateur



(D) Iles Canaries

Figure 2 : Cartes des zones échantillonnées (A) et (B) Amérique Centrale, (C) Amérique du Sud, et (D) Iles Canaries.

2. Les gènes mitochondriaux

L'ADN mitochondrial est largement utilisé comme marqueur moléculaire en génétique des populations car il permet l'observation de plusieurs échelles taxonomiques au sein d'une même espèce (Farias 2001). Il est par exemple utilisé en phylogénétique (niveau inter-spécifique) et en phylogéographie (niveau intra-spécifique).

La vitesse d'évolution de l'ADN mitochondrial est très importante. Cette caractéristique est probablement due à une réparation inefficace de l'ADN pendant la réplication (Clayton 1984). Les différentes régions du génome mitochondrial évoluent à des rythmes différents (Saccone *et al.* 1991), ce qui permet de choisir des régions appropriées au niveau taxonomique et au sujet étudié. L'ADN mitochondrial est hérité de la mère dans la plupart des espèces et, sauf dans des cas isolés (Eyre-Walker *et al.* 1999, Hagelberg *et al.* 1999), il ne recombine pas. Les individus sont donc généralement homoplasmiqque pour un haplotype mitochondrial.

Dans notre étude, nous avons choisi d'utiliser comme marqueur un fragment du gène mitochondrial *cytochrome b* (*cyt b*). Le *cyt b* est un des gènes les plus utilisés pour les travaux en phylogénétique. Plusieurs études ont montré l'efficacité de ce gène pour élucider les relations phylogénétiques au niveau populationnel (Meyer 1994).

Le polymorphisme d'un fragment d'environ 800 paires de bases de ce gène a été étudié sur des insectes de plusieurs populations issues de différents pays: la zone d'origine probable, le Guatemala (voir pag 29 et 30), ainsi que tous les pays appartenant à la zone envahie, le Venezuela, la Colombie, l'Equateur et les Iles Canaries.

Cependant, en ce qui concerne les espèces invasives, plusieurs études ont montré une réduction très importante de la variabilité génétique des populations invasives au niveau des

marqueurs mitochondriaux (Ahern *et al.* 2009). Ce manque de polymorphisme des marqueurs mitochondriaux réduit considérablement les possibilités d'analyse de ces populations.

Comme signalé précédemment l'ADN mitochondrial est haploïde et hérité de façon maternelle ; son effectif efficace est quatre fois plus petit que celui d'un marqueur hérité de façon Mendélienne. De ce fait, la dérive génétique agit davantage sur l'ADN mitochondrial. Il peut alors présenter, au sein des populations, une plus faible diversité génétique que l'ADN nucléaire. Cette réduction relative de la diversité peut être très marquée chez les populations invasives qui ont subi de forts goulots d'étranglement.

Pulliandre *et al.* (2008) ont montré une forte réduction de la diversité génétique de *T. solanivora* dans les populations invasives (voir chapitre I). Le manque de diversité génétique observé au niveau mitochondrial dans ces populations rend impossible leur analyse approfondie.

C'est pour cette raison que nous avons décidé de développer en parallèle des marqueurs microsatellites.

3. Les microsatellites

Les microsatellites sont les principaux marqueurs génétiques utilisés dans les analyses de génétique de populations (Ji *et al.* 2003). Ce sont des séquences d'ADN constituées d'un court motif nucléotidique de 1 à 5 ou 6 paires de bases (le plus souvent, on se limite à des dinucléotides au trinucleotides) répété en tandem direct. La taille totale de la répétition est généralement inférieure à 100 pb. Il existe un nombre relativement faible de motifs répétés simples repartis d'une façon supposée aléatoire sur plusieurs dizaines de milliers de sites dans

le génome. La spécificité de chaque microsatellite et son assignation à un seul locus dans le génome, est assurée par des séquences uniques qui encadrent la répétition.

Leur polymorphisme est dû à des variations du nombre de motifs dans la répétition (plus rarement des délétions ou additions de simples bases). Les variations de longueur sont classiquement attribuées à des dénaturations passagères et locales dans la répétition au cours de la réplication. C'est cette variation de longueur qui permet d'identifier les allèles de chacun de ces locus. Les dérapages réplicatifs sont relativement fréquents et expliquent les taux de mutation élevés (5.10^{-4}) et donc un important polymorphisme, qu'il soit mesuré par le nombre d'allèles ou par l'hétérozygotie réalisée.

Les microsatellites ont de nombreux avantages par rapport aux autres marqueurs génétiques car la plupart du temps ce sont des marqueurs hypervariables, monolocus, codominants et ils sont nombreux dans la plupart des génomes. De plus, ils sont répartis de façon relativement homogène, et les allèles sont facilement identifiables par PCR.

Cependant chez les Lépidoptères, les séquences flanquantes d'un locus peuvent être partagées par plusieurs locus ce qui complique leur utilisation. De plus, leur abondance dans le génome est inférieure à celle de la plupart des autres ordres d'insectes. Dans cette thèse, 9 locus microsatellites ont été développés (Fig. 3, pour détails, voir chapitre II sur la difficulté d'isolement et de caractérisation de microsatellites chez les lépidoptères).

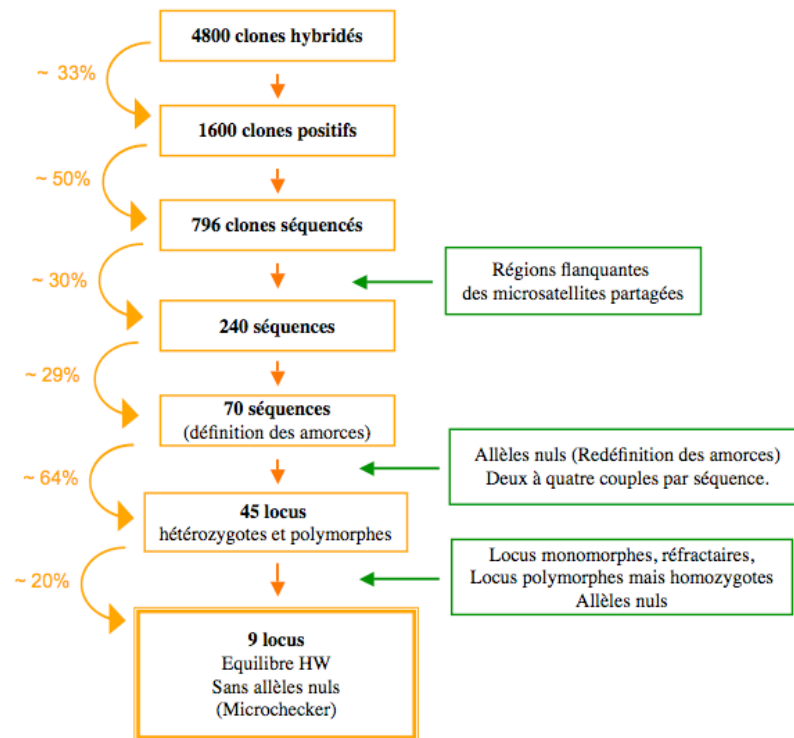


Figure 3 : Etapes de sélection des locus

L'ensemble des outils moléculaires présentés dans ce chapitre devrait nous permettre de répondre aux objectifs définis dans le chapitre précédent.

Chapitre I:

Utilisation d'un marqueur mitochondrial pour déterminer l'aire d'origine de *Tecia solanivora* et retracer ses routes d'invasion

L'identification de la zone d'origine des espèces invasives ainsi que l'étude des changements génétiques survenus pendant le processus de colonisation sont utiles pour mieux comprendre les invasions biologiques et les mécanismes qui permettent l'établissement et la propagation des espèces invasives (voir introduction pour plus de détails). Le niveau de diversité génétique des populations introduites est considéré comme un facteur important car il influence leurs capacités de survie et d'adaptation dans les nouvelles aires de répartition (Sakai *et al.* 2001; Lee 2002; Petit *et al.* 2004). Le processus invasif peut avoir différentes conséquences sur la diversité génétique des populations introduites car ces populations sont composées d'un sous-échantillon de génotypes originaire d'une ou de plusieurs populations source. Ces conséquences peuvent se traduire par :

- (i) la réduction de la variabilité génétique des populations invasives (par exemple dans le cas d'un seul événement d'introduction provenant d'une seule population source) (Lee 2002). La perte de diversité dans ce cas sera liée au

nombre d'individus introduits et à une éventuelle dérive génétique subséquente. En effet, plus la quantité d'individus introduits est faible et plus la dérive génétique va agir ; rappelons qu'elle sera plus marquée sur l'ADN mitochondrial que sur l'ADN nucléaire. Un autre processus pouvant expliquer la perte de variabilité génétique serait la sélection naturelle. La pression de sélection pourrait par exemple, par balayage sélectif, éliminer des haplotypes non adaptés à la nouvelle aire colonisée (Wares *et al.* 2005).

- (ii) la diversité génétique des populations invasives pourrait être supérieure à celle de populations source (Genton *et al.* 2005; Simon-Bouhet 2006), par exemple dans le cas d'une structuration génétique des populations source, suivie par plusieurs événements discrets d'introduction et d'admixture dans la nouvelle aire colonisée.
- (iii) Il est aussi possible que la variabilité génétique des populations source et invasives soit équivalente. Ce cas de figure peut se présenter quand il y a introduction d'un grand nombre d'individus provenant de populations source génétiquement homogènes, mais également dans le cas d'une expansion consécutive à un événement irréversible de suppression d'une barrière naturelle. Le nombre de colonisateurs sera donc limité uniquement par les capacités de dispersion propres à l'espèce (Hassan *et al.* 2003).

L'analyse de l'ADN mitochondrial s'est avérée un bon outil pour déterminer l'origine unique ou multiple des espèces invasives, notamment dans le cas de populations génétiquement structurées (Cognato *et al.* 2005; Wang *et al.* 2009). Il a aussi permis de détecter des goulots d'étranglement dans un large éventail d'envahisseurs (Frankham 2005; Golani 2007; Puillandre *et al.* 2008; Kochzius & Nuryanto 2008; Wang *et al.* 2009).

Finalement il a également été utilisé avec succès pour démontrer l'existence de processus d'hybridation de populations dans les nouveaux habitats colonisés.

La première étude portant sur la génétique de *T. solanivora* a été publiée par notre équipe en 2008. Dans cet article, nous avons analysé les changements de la diversité génétique de l'espèce dans son aire de répartition à l'aide du marqueur mitochondrial *cyt b*. Pour ce faire, nous avons séquencé ce gène chez 127 individus: 46 appartenant à un pays d'Amérique centrale supposée comme étant l'aire d'origine de l'espèce (le Guatemala) et 81 individus provenant de quatre des pays de la zone envahie: le Venezuela, la Colombie, l'Équateur et les Iles Canaries. Le travail a été accompagné par une recherche bibliographique (articles parus dans la littérature entre 1998 et 2006) aboutissant à l'étude de 57 publications portant toutes sur l'analyse des espèces invasives à l'aide de gènes mitochondriaux et de marqueurs microsatellites. Cette recherche a eu comme objectif de comparer la diversité génétique de ces 57 espèces dans leur aire d'origine et dans les zones colonisées. La quantification de cette diversité a été faite à partir du nombre d'haplotypes et du nombre d'allèles présents (ADNmt et microsatellites respectivement). Nous avons choisi d'analyser le nombre d'haplotypes et le nombre d'allèles plutôt que l'hétérozygotie car ils sont plus sensibles aux effets du bottleneck.

L'analyse de *T. solanivora* ainsi que l'analyse des 57 publications sélectionnées ont permis de donner une vision générale des changements génétiques suivis par les espèces envahissantes lors du processus de colonisation. Dans le cas de *T. solanivora* nous avons trouvé une diversité haplotypique importante $h = 0,97$ au Guatemala, tandis que 3 haplotypes seulement ont été détectés au Venezuela et 1 seul (commun à tous les pays) dans le reste de la zone envahie: Colombie, Équateur, Iles Canaries. En ce qui concerne l'analyse

bibliographique, 80,5% des études sélectionnées signalent une perte de diversité génétique entre la zone d'origine et la zone d'invasion. Cette approche couplée nous a donc permis de suggérer que la perte de diversité génétique est une conséquence importante et fréquente des processus d'invasion. De plus, nous avons démontré que l'utilisation de l'ADN mitochondrial permettait la détection de la perte de diversité génétique au cours du processus d'invasion. Finalement, l'analyse de 127 individus de *T. solanivora* dans cette première étude a démontré que le ou les goulot(s) d'étranglement subis par l'espèce pendant la phase d'invasion ont été parmi les plus importants décrits jusqu'à présent dans la littérature. Cependant, l'échelle populationnelle n'a pas pu être étudiée dans cet article à cause du faible nombre d'individus échantillonnés par localité d'échantillonnage (de 1 à 10). Nous avons donc décidé d'augmenter l'effort d'échantillonnage (Puillandre *et al.* 2008).

Dans un deuxième temps, nous avons donc séquencé 541 individus afin (i) de délimiter la zone d'origine des espèces, (ii) d'analyser la structure génétique de *T. solanivora* dans sa zone d'origine, (iii) de décrire l'évolution génétique des populations de l'espèce au cours du processus de colonisation. Bien que, dans cette partie, nous nous soyons particulièrement concentrés sur *T. solanivora*, notre approche a été également l'occasion de confirmer l'efficacité du marqueur *cyt b* pour délimiter la zone d'origine d'une espèce d'insectes invasif, décrire les routes d'invasion et déterminer les modifications génétiques qui se produisent dans les populations invasives au cours du processus de colonisation. Cette approche par le seul marqueur cytoplasmique pourrait être utile, notamment pour les espèces de lépidoptères pour lesquelles le développement de marqueurs moléculaires comme les microsatellites est une tâche très difficile (voir chapitre II).

Pour atteindre ces objectifs nous avons élargi l'échantillonnage aussi bien en nombre d'individus qu'en nombre de sites géographiques (en nombre d'individus, il est presque 4 fois et demi plus grand). Pour mieux définir l'aire d'origine de l'espèce, nous avons analysé un deuxième pays d'Amérique Centrale, le Costa Rica, où *T. solanivora* est présente et qui pourrait faire partie de l'aire d'origine de l'espèce. Au Guatemala (la région d'origine présumée de l'espèce), nous avons échantillonné 8 localités dans deux régions différentes: Huehuetenango et Quetzaltenango, correspondant aux branches nord et sud des montagnes de la Sierra Madre. Trois à sept sites ont été échantillonnés dans les autres pays analysés: Costa Rica, Venezuela, Colombie, Équateur et les Iles Canaries.

Pour comparer la diversité génétique de *T. solanivora* dans les pays échantillonnés nous avons pris en compte le nombre d'haplotypes, la diversité haplotypique et nucléotidique et le nombre de sites polymorphes. Comme cela a été constaté par notre première étude et par d'autres auteurs les populations autochtones montrent souvent de niveaux plus élevés de diversité génétique par rapport aux populations introduites. La valeur de ces indices s'est révélée nettement plus élevés au Guatemala (c'était le cas pour toutes les populations étudiées) que dans les autres pays analysés. En effet, les populations du Costa Rica montrent une forte perte de diversité génétique comparativement aux populations du Guatemala. Malgré une augmentation notable de l'effort d'échantillonnage, la diversité génétique reste très faible puisque 6 haplotypes seulement ont été détectés au Venezuela et la Colombie, l'Équateur et les Iles Canaries montrent un seul haplotype commun aux trois pays.

Cependant, si cet haplotype n'a pas été retrouvé au Guatemala, il est proche des haplotypes trouvés dans ce pays. Cet important changement, dans la diversité génétique, peut être considéré comme une signature d'un ou plusieurs bottlenecks génétiques qui se sont produits entre le Guatemala et le reste des pays de la zone envahie.

L'hypothèse d'une origine guatémaltèque de *T. solanivora* est également soutenue par l'analyse démographique, qui a montré que toutes les populations du Guatemala étaient en équilibre démographique plutôt qu'en expansion, alors que les populations originaires du Costa Rica et d'autres pays présentaient une signature génétique d'expansion populationnelle. Les résultats des analyses AMOVA (analyse de la variance moléculaire) et SAMOVA (analyse spatiale de la variance moléculaire) confirment également que le Costa Rica fait partie des pays envahis. La plus haute Φ_{CT} -Value est observée lorsque le Costa Rica est inclus dans la zone envahie, en outre l'analyse SAMOVA groupe toujours le Costa Rica dans le groupe des pays de la zone colonisée. Ces résultats sont en accord avec les données historiques. Bien que nous n'ayons pas de certitude historique sur une introduction du ravageur dans ce pays, *T. solanivora* a été effectivement observé d'abord au Costa Rica (Murillo 1980) au cours d'une période d'importation croissante de semences de pomme de terre en provenance du Guatemala dans les années 70 (Cifuentes 1980; Christiansen 1980). L'hypothèse d'une propagation naturelle du ravageur du Guatemala vers le Costa Rica peut être mise en cause car la culture non intensive de la pomme de terre au Salvador, au Honduras et au Nicaragua, a pu créer une discontinuité agro-écologique, limitant la propagation naturelle de l'espèce.

Nous avons constaté une structuration génétique des populations de *T. solanivora* dans l'aire d'origine. En effet, les résultats de l'AMOVA montrent une différence significative entre les deux régions analysées au Guatemala (Huehuetenango et Quetzaltenango), correspondant respectivement aux branches nord et sud de la montagne Sierra Madre. La vallée entre les branches peut être à l'origine de cette différenciation en limitant le flux de gènes entre ces régions. Par ailleurs seuls quatre haplotypes sur les cinquante trouvés au Guatemala sont partagées par les deux régions échantillonnées.

Les résultats de l'analyse SAMOVA et les valeurs de Φ_{st} montrent que les populations de Quetzaltenango ne sont pas très différenciées au contraire de celles de l'État de Huehuetenango. Il est possible que les échanges commerciaux de pomme de terre dans la zone de Quetzaltenango soient plus élevés que dans la région de Huehutenango, ce qui produirait une homogénéisation plus importante des populations dans cette région (Dardon, comm. personnelle.).

En ce qui concerne le processus de colonisation, dans certains cas, l'analyse de la diversité génétique au travers de l'étendue de la zone envahie, peut indiquer l'ordre chronologique de la colonisation (Rollins *et al.* 2009). En effet, la valeur de la diversité présente dans chaque pays peut être utilisée pour inférer l'ordre des colonisations par l'espèce (Kawamura *et al.* 2006). Dans notre cas, l'analyse des différentes populations envahies confirme la colonisation séquentielle de *T. solanivora* depuis la zone d'origine au Guatemala vers le Costa Rica, le Venezuela, la Colombie, l'Équateur et enfin aux Iles Canaries. La perte progressive de la diversité génétique observée entre le Guatemala et les pays envahis est conforme à une colonisation progressive de *T. solanivora*. Entre autres, les valeurs de Φ_{st} sont également compatibles avec cette séquence. Tous les Φ_{st} entre le Guatemala et le reste de pays sont hautement significatifs, les valeurs de Φ_{st} observées entre les pays voisins sont plus faibles que les valeurs entre les pays non voisins. Cela indique que la différenciation génétique augmente au fur et à mesure que l'invasion s'étend. Ces résultats sont aussi en accord avec les données historiques recueillies: l'espèce a été d'abord signalé au Guatemala en 1956, et ensuite seulement au Costa Rica en 1970, au Venezuela en 1983, en Colombie 1985, et enfin aux Iles Canaries en 1999.

Dans la première étude citée dans ce chapitre nous avons observé une perte importante de diversité génétique de *T. solanivora* (quantifiée par le nombre d'haplotypes) entre le Guatemala et le Venezuela. La deuxième étude montre que la perte de la diversité génétique entre le Guatemala et le Venezuela est due à au moins deux goulots d'étranglement: le premier entre le Guatemala et le Costa Rica, le second entre le Costa Rica et le Venezuela. Un autre goulot d'étranglement s'est produit entre le Venezuela et les pays qui ont été envahis plus tard. Ceci suggère que plusieurs épisodes de balayage démographique ou sélectif se sont produits dans le compartiment du génome mitochondrial au cours du processus d'invasion. La perte de la variabilité génétique entre le Guatemala et le Costa Rica pourrait être expliquée par une introduction de quelques individus en provenance du Guatemala vers le Costa Rica, provoquant un goulot d'étranglement fort, ou l'introduction d'un nombre plus important d'individus suivis par des pressions de sélection conduisant à une réduction du nombre d'haplotypes. La fréquence élevée d'un haplotype particulier et la présence de quelques haplotypes rares au Costa Rica rappelle la situation observée au Guatemala (4 haplotypes majoritaires, plusieurs haplotypes en basse fréquence). Cette observation suggère un événement unique d'introduction au Costa Rica. Si l'introduction au Costa Rica avait été multiple, nous aurions pu nous attendre à l'introduction stochastique d'au moins un autre haplotype majeur dans ce pays. Un goulot d'étranglement final a été détecté entre le Venezuela et les autres pays (un seul haplotype est présent en Colombie, en Equateur et aux Iles canaries). Notre résultat suggère un scénario d'invasions successives, résultant d'une série de goulots d'étranglement au fur et à mesure que les fondateurs colonisent de nouveaux pays. Ce résultat a été signalé auparavant par Clegg *et al.* (2002) ainsi que par Hawley *et al.* (2008). Dans ce type de scénario d'invasion, la diversité génétique diminue au fur et à mesure que progresse dans le temps le rang d'introduction (Wares *et al.* 2005).

Concernant l'identification de la population source, les valeurs de Φ_{st} , relativement faibles entre la population de Quetzaltenango (GU5) au Guatemala et le reste de pays de la zone envahie, ainsi que l'inclusion des haplotypes du Costa Rica dans la diversité haplotypique au Guatemala, suggère que les populations envahies pourraient être originaires de la région de Quetzaltenango.

L'analyse du marqueur mitochondrial cytochrome *b* s'est avérée utile pour délimiter l'aire d'origine de *T. solanivora*, il a aussi permis d'analyser la structure génétique de l'espèce dans sa zone d'origine. Ce marqueur avait été utilisé auparavant pour détecter des goulots d'étranglement, mais rarement de scénarios comme celui que l'on a proposé ici. Le marqueur mitochondrial a confirmé les données historiques recueillies sur l'invasion, prouvant ainsi leur utilité pour déduire des scénarios d'invasions biologiques récentes.

Cependant la comparaison avec d'autres marqueurs moléculaires est souhaitable. Puisque les pressions d'évolution n'agissent pas de la même façon dans les deux compartiments du génome (nucléaire et mitochondrial), il est intéressant de comparer les informations issues du *cyt b* à celles d'un marqueur nucléaire. En outre l'utilisation d'un marqueur nucléaire s'avère nécessaire pour étudier les populations issues des pays où aucune variabilité génétique a été détecté (Colombie, l'Équateur et les Iles Canaries).

Nous avons choisi de développer des locus microsatellites car ils présentent des avantages par rapport aux autres marqueurs génétiques (hypervariables, monolocus, codominants).

Genetic bottleneck in invasive species: the potato tuber moth adds to the list

Acceptés dans *Biological Invasions* (2008), 10, 319-333.

N. Puillandre^{1,2}, S. Dupas¹, O. Dangles³, J.-L. Zeddam³, C. Capdevielle-Dulac¹, K. Barbin¹,
M. Torres-Leguizamon¹, J.-F. Silvain¹

¹IRD, UR 072, Biodiversité, et Evolution des Complexes Plantes-Insectes Ravageurs-Antagonistes, CNRS, Lab. EGS, Gif/Yvette, France.

²UMR 7138, Systématique, Adaptation et Evolution UPMC-IRD-MNHN-CNRS, Service de Systématique moléculaire (CNRS, IFR 101), Département Systématique et Evolution, Muséum National d'Histoire Naturelle, CP26, 57 rue Cuvier, Paris Cedex 05 75231.

³Laboratorio de Bioquímica y Microbiología. IRD-Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.

Introduction.

The relationships between the success of invasive populations and the genetic changes occurring during the invasion process, through genetic drift, population admixture or natural selection, have recently received special attention (Facon *et al.* 2006). In particular, the level of genetic diversity of introduced populations is considered as an important factor influencing their survival and adaptive capacities (Sakai *et al.* 2001; Lee 2002; Petit *et al.* 2004). An introduced population, whether arising from natural dispersal events or aided by human vectors, is composed of a sub-sample of genotypes, originating from one or several populations in the area of origin. Introduction processes can be classified into three categories with respect to their expected consequences on genetic diversity. (i) Contiguous expansion after an irreversible event of natural barrier removal (e.g. canal opening). In this case, the number of colonizing individuals is limited only by the dispersal capacities of the species (Hassan *et al.* 2003). If the latter is sufficient, the genetic diversity of the introduced population may be similar to that in the area of origin. (ii) Several discrete introduction events from several native populations. Even if each introduced population contains only a part of the genetic diversity of the species in its area of origin, the mixture of those populations may result in a high level of diversity in the introduced population (Genton *et al.* 2005). (iii) Single introduction event from a single native population. Many biological invasions belong to this category (Lee 2002). If the introduced population is small, and depending on the extent and duration of a population bottleneck, strong loss of genetic variability can be detected (Amsellem *et al.* 2000; Jousson *et al.* 2000; Le Page *et al.* 2000; Martel *et al.* 2004; Taylor *et al.* 2004). The success of the invasion is here seen as a paradox (Hassan *et al.* 2003; Kolbe *et al.* 2004). Nevertheless Wares *et al.* (2005) and Novak & Mack (2005) both observed that even in such situations, reduction in genetic variability can be minimal, and founder populations may retain the ability to respond to natural selection in the invaded environment.

To be able to discuss the relationships between genetic diversity and invasion success of a species, it is necessary to not only know its level of genetic variability in both native and invaded range but also precisely its biology and the history of the invasion. Invasions involving very few propagules are of particular interest to characterise thresholds below which bottlenecks may limit invasion success.

T. solanivora (Povolny 1973) is a tiny Gelechiid Lepidoptera whose larvae attack exclusively *S. tuberosum* L. tubers both in the field and in potato stocks. In the Northern Andes, *T. solanivora* mostly occurs at medium and high altitudes (1300– 3000 m) (Povolny 1973; Torres *et al.* 1997). Development time from eggs to adults varies from 197 days at 10°C to 42.7 days at 25°C (Nino 2004) and the number of generations varies from 2 at 10°C to 10 at 25°C (Notz 1996). *T. solanivora* was first described by Povolny (1973) from moths and larvae collected in Costa-Rica but the moth was likely introduced in that country after a shipment of potato seeds from Guatemala in 1970 (Povolny 1973). Nino (2004) also reports potato damage likely produced by *T. solanivora* in Guatemala in 1956. The limits of the area of origin of *T. solanivora* outside of Guatemala remain obscure. There is no record of *T. solanivora* in Mexico to the North, but we cannot exclude its presence in the state of Chiapas, adjacent to Guatemala, considering the continuity of the sierras between the two countries. To the South, the first reports of the moth in Honduras and Salvador are from localities close to Guatemalan border (Torres 2003). No historical data are available for Nicaragua where this insect was already present in the eighties (King & Saunders 1984). The putative area of origin of *T. solanivora* may be considered therefore to range from the Isthmus of Tehuantepec in Mexico to Northern Honduras and Salvador.

After its introduction into Costa-Rica in 1970, *T. solanivora* was introduced in 1973 into Panama (Povolny 1973; Nino 2004). At populations were recorded in Honduras and Salvador (Torres 2003; Nino had been introduced into Venezuela (state of Tachira) via highly

infested potato seeds imported from Costa Rica (Salazar & Escalante 1984). The species has since been detected in Colombia in 1985 (Rincon & Lopez-Avila 2004), in Ecuador in 1996 (Gallegos *et al.* 1997) and in the Canary Islands in 1999 (Nino 2004). *T. solanivora*, in association with other Gelechiid pests like *Phthorimaea operculella* (Zeller 1873), is now considered as the major crop pest for potatoes in Central America and Northern South American countries (Pollet *et al.* 2003; Bosa *et al.* 2005). The presence of *T. solanivora* in Peru has not yet been reported, despite its common border with southern Ecuador. According to the available literature, each major introductory event (Guatemala to Costa Rica, Costa Rica to Venezuela and Venezuela to Colombia) has resulted from one or a few events of potato seed importation. Nevertheless short distance cross-border potato commercial exchanges have also played a role in the geographic expansion of the insect, especially between Colombia and Ecuador. The introduction into the Canary Islands has been attributed to the illegal importation of one bag of infested potatoes from South America (EPPO 2006).

The immediate objective of this study is to investigate the genetic diversity of *T. solanivora* in both native and colonized ranges to document changes in genetic diversity during the invasion of South America and Canary Islands. Considering the species history of invasion, new *T. solanivora* geographic populations have likely been initiated by sequential colonization of a low number of individuals from one population to the next, a process that may favour a decline in genetic diversity as outlined by Wares *et al.* (2005). The relation between genetic variability and invasion success will then be discussed, drawing a general picture of invasive species genetic changes between native and introduced area, based on recent literature review.

Materials and methods

Sampling protocol

Adults *T. solanivora* were collected between 2003 and 2005 in 35 sites from five different countries of both putative native and invaded areas (Guatemala, Venezuela, Colombia, Ecuador and the Canary Islands) (Fig. 1). Collected moths were killed in 95% ethanol. About 127 individuals (one to thirteen from each site, see Table 1) were sequenced for the genetic analysis.

Total DNA was extracted from the thorax (remaining part of the body is kept as vouchers) using the Qiagen DNeasy Tissue kit. A fragment of the Cytochrome b gene (Cyt b) was PCR-amplified using primers CP1 (50-GATGATGAAATTTTGGATC-30, modified from Harry *et al.* 1998) and Tser (50-AATAAGCATTTGTTTTGAA-30, Jermini and Crozier 1994). When PCR was unsuccessful, internal primers between CP1 and Tser were used in combination, leading to the same fragment after concatenation: CB1 (50-TATGTACTACCATGAGGACA AATATC-30, Simon *et al.* 1994), CB2 (50-ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT-30, Simon *et al.* 1994), CB3H (50-AGCAAATAAAAAATATC- ATTC-30, Palumbi *et al.* 1991) and CB3RL (50-CATATTCAACCTGAATGATATTT-30, Palumbi *et al.* 1991). All PCR reactions were performed in 25 µl, containing approximately 3ng of DNA, 1X reaction buffer, 3 mM MgCl₂, 0.24 mM dNTP, 0.4 mM of each primer and 1 unit Taq polymerase (Promega). The reaction consisted of an initial denaturation step at 92°C for 5 min, followed by 30 cycles of denaturation at 92°C for 1 min, annealing at 46°C for 1 min 30 s and extension at 72°C for 1 min 30 s. The final extension was at 72°C for 5 min.

PCR products were purified using the PCR clean up system (Promega). Sequencing was performed on both DNA strands using ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction System, version 1.1., and products were run on an automated sequencer

(Applied Biosystems 3130). Sequences were deposited in GenBank (Accession numbers: DQ780464–DQ780540 and EF212179–EF212229).

DNA analysis

Sequences alignment was performed manually using MacClade 4.07 (Maddison and Maddison 2000). The number of haplotypes in each locality and haplotypic diversity were estimated (Nei 1987). A 95% statistical parsimony network was estimated using TCS 1.21 (Clement *et al.* 2000).

Literature review on the genetics of invasions

To discuss our results quantitatively, in the broad perspective of invasion genetic diversity, we conducted a survey of the current literature using the “Web of science” search engine. The search was limited to English written articles, published between 1998 and 2006, within life sciences subject categories. The following query key was used: TS = (inva* AND (mtDNA OR mitochond* OR microsat*)). The word “inva*” can refer to “invasive”, “invasion” or invaded”, and the search was limited to studies based on the marker used in our study (mitochondrial), and also on microsatellite markers to allow a comparison between two markers linked to different genomic compartments. Only articles dealing with human-mediated invasion and genetic diversity were retained.

Out of the 128 articles, only 62 contained quantified information on the genetic diversity (measured as the number of haplotypes or the number of alleles) in both native and invaded ranges, by using mitochondrial or microsatellite markers. Genetic diversity statistics (the number of alleles or number of haplotypes) were preferred to heterozygosity because they are more sensitive to bottleneck effects (Nei *et al.* 1975; Novak & Mack 2005) and were considered to offer an accurate estimate of the strength of the genetic bottleneck as long as

sample size is taken into consideration. Spearman's correlation between sampling effort and genetic variability was calculated using R (R Development Core Team 2004).

Results

Genetic variability

An 898 pb fragment of mitochondrial Cyt b was sequenced from the 127 *T. solanivora* individuals from the origin and invaded areas. About 28 different haplotypes were found among the 46 individuals from Guatemala, with a haplotypic diversity of 0.97. Three different haplotypes were found in Venezuela and only a single one in Colombia, Ecuador and Canary Islands, among the 65 individuals sequenced from localities of the invaded area (Fig. 2). These invasive haplotypes are included in the Guatemalan clade but have not been observed among Guatemalan individuals.

Literature review on the genetics of invasions

About 80.5% of studies included in our literature review reported a lower genetic diversity in invasive populations when compared to native ones (Table 2). To take into account sample bias effects, results in Table 2 were represented by plotting ratios of genetic diversity between populations sampled in the invaded and the native range as a function of ratios of sample size between invaded and native range. This was done for both mitochondrial and microsatellite markers (Fig. 3a and b).

In each figure, two rectangular zones (D and H) identify studies reporting higher genetic diversity in invasive samples than in native ones (noted zone D for Diversification) from those reporting the inverse (noted zone H for Homogenization). Within these two zones, the reliability for an evidence of 'genetic diversification' or 'genetic homogenization' following the invasion process is strongly influenced by the ratio of sampling size between

invaded and native ranges. For instance, studies 14 (Moyer *et al.* 2005) and 38 (Bachelet *et al.* 2004) both showed higher genetic variability in invasive population samples than native ones. However, in study 14, the sampling effort was c.a. seven times higher in the exotic range than in the native one, making any conclusions about a genetic diversification in the invaded range highly speculative. In contrast, the sampling effort in the study 38 was c.a. two times lower in the exotic range than in the native one, supporting the hypothesis of a genetic diversification following invasion. We therefore expressed the reliability of inferences of ‘diversification’ or ‘homogenization’ during invasion using a grey gradient from light (low reliability D^- and H^-) to dark (high reliability D^+ and H^+). For mitochondrial markers, most studies reporting an increase (zone D^+) or a decrease in genetic diversity (zone H^+) in invasive populations belong to the ‘low reliability zones’ D^- and H^- . Genetic bottlenecks (zone H^+) have been mostly identified using microsatellites. Overall, only one study (Bachelet *et al.* 2004), using a mitochondrial marker, confidently reports a diversification in invasive population sampled compared to native ones with higher sampling in the native zone (zone D^+). Conversely, ten studies using a mitochondrial marker and 22 using microsatellites confidently show homogenization between native and invasive samples with higher sampling in the invaded area (zone H^+).

We found that mitochondrial diversity was positively correlated to sampling effort ($\ln(Y) = 0.68 \cdot \ln(X) - 1.13$, $R^2 = 0.428$, $P_{\text{Spearman}} < 0.05$): higher mitochondrial diversity in the invaded zone was related to higher sampling effort. In contrast, microsatellite data did not show any significant relationship with sampling effort ($\ln(Y) = -0.03 \cdot \ln(X) - 0.35$, $R^2 = 0.003$, $P_{\text{Spearman}} = 0.875$).

Discussion

Genetic differences between native and introduced populations of *T. solanivora*

The highest mitochondrial diversity of *T. solanivora* was found in Guatemala, with several haplotypes in six out of eight sampled populations. This is consistent with Guatemala being included in the native range of the species. The low level of genetic variability encountered in Venezuela and the lack of variability in Colombia, Ecuador and the Canary Islands are also consistent with the fact that these countries are part of the invaded range, and suggest that the Canary Islands were invaded by individuals from South America. Assuming that *T. solanivora* was introduced during a single event (Salazar and Escalante 1984), two scenarios can be proposed to explain these genetic results. First, the invasion of South America by *T. solanivora* could originate from a single introduction event of a few individuals showing a reduced number of cyt b haplotypes. The population introduced to Venezuela contained the three haplotypes found in this country, only one of which has been introduced in the remaining invaded range. Second, it is possible that a larger number of haplotypes were introduced to South America, as several haplotypes can be found in each population in Guatemala. Then, selection pressure may have lead to the disparition of all but a few haplotypes, successful in the invaded range.

Prevalence of genetic bottlenecks in invasive species

Our literature review revealed a general trend of reduction in genetic diversity from native to invaded areas (but see Novak & Mack 2005 and Wares *et al.* 2005 for an alternative opinion). Several studies (which were not detected by our search protocol) also reported evidence of extremely low genetic diversity among colonists (e.g. Amsellem *et al.* 2000; Kliber & Eckert 2005; Poulin *et al.* 2005). In 86% of the microsatellite studies, less diversity

was observed in the invasive range sample compared to the native one. Since no sampling size bias was observed in the microsatellite studies (see Fig. 3B and discussion below), this value may be considered as a broad estimate of the prevalence of reduction of genetic diversity during biological invasions. For mitochondrial data, the sampling bias complicates the interpretation, but it appears that *T. solanivora* reduction in mitochondrial diversity is among the highest reported in the literature.

The contrasting effect of sampling size on the genetic diversity ratio (invaded/native) between microsatellite and mitochondrial studies is an interesting result per se. On the one hand, we found no effect of sampling size on the genetic diversity estimated using microsatellite data. On the other hand, mitochondrial data were significantly affected by the sampling size ratio between native and invaded areas. The diploid nature of microsatellites vs. the haploid nature of mitochondrial markers may explain this result: for the same sampling effort, the number of haploid nuclear genomes is twice that of mitochondrial genomes sampled. The conclusion is that greater sampling efforts should be performed in future studies dealing with mitochondrial markers. The estimation of the genetic variability may also be ameliorated by sampling different populations in each area, with several specimens in each population. This is particularly true for the study of multiple introductions that may lead to admixture events in the invasive area (Novak & Mack 2005).

Genetic bottlenecks and invasion success

A genetic bottleneck, such as that observed for *T. solanivora*, is expected to have a negative effect on fitness through a loss of heterozygosity (Reed & Frankham 2003). However, this genetic bottleneck has not prevented *T. solanivora* from becoming one of the most successful invasive agricultural pests across the Northern Andean region. *T. solanivora* therefore represents another example illustrating the genetic paradox in invasive species

(Frankham 2005). Both genetic mechanisms and environmental factors may have facilitated the invasion success despite a reduced genetic variability. The lack of reliable information about the environmental factors (natural enemies, agricultural practices) controlling *T. solanivora* populations in both native and invaded areas forces us to concentrate on the genetic mechanisms.

Understanding the adaptive potential of a species after a bottleneck, and more generally the relationship between molecular neutral and adaptive variation, is an important issue for both invasive biology (Wares *et al.* 2005) and conservation biology (Reed & Frankham 2003). In their meta-analysis study, Reed & Frankham (2001) did not show any relationship between heritability and molecular diversity across taxa, suggesting that the reduction of adaptive potential after a bottleneck is not significant. The simplest hypothesis therefore is that significant additive variance is present despite reduced molecular variation (as measured by mitochondrial markers) which would allow adaptive evolution of bottlenecked populations (Hanfling & Kollmann 2002; Hassan *et al.* 2003). The additive variation before the bottleneck may exceed the variation required for adaptive evolution, and enough variation may be retained post-bottleneck. In addition, epistatic variance can be converted to additive variance after a bottleneck (Lindholm *et al.* 2005) thereby restoring potential response to natural selection. As an alternative to these hypotheses related to additive variation, hypotheses within the framework of Fishers adaptive landscape theory predict that drift during introduction play a role in exploring new adaptive trajectories in the invasive range (Carroll & Dingle 1996; Wares *et al.* 2005). Our study on *T. solanivora* suggests that loss of diversity can be high and drift may also play a role in evolutionary change between native and invasive populations. This contrasts to Wares *et al.* (2005) review of heterozygosity comparisons between native and invasive populations which suggests that natural selection is the major determinant of evolutionary trajectories of invasive populations.

Other genetic mechanisms such as epigenetic preadaptation or post-invasive adaptive mutation (see Perez *et al.* 2006) may have also played a role in the invasive success of *T. solanivora*. A better understanding of these mechanisms will require further studies on populations and environments in both native and invaded areas through the analysis of nuclear markers and the comparison of fitness-related traits. The results presented here for *T. solanivora* and the analysis of 57 recent papers demonstrate that reduction of genetic diversity is common but not a limiting factor for the success of an invasive species.

Acknowledgements

The authors are thankful to the program ECOS/ICFES/COLCIENCIAS/ICETEX and their members, especially Aristobulo Lopez Avilla and Alba Marina Cotes at CORPOICA, as well as to P. Gallegos and J. Suquillo at INIAP, Ecuador, to A. Herna Nino at INIA, Venezuela, and to E. Trujillo at STA, Tenerife for their help in insect collection or for sharing informations. The authors are also pleased to thank N. Faure and I. Giffard for their technical assistance and D. Couch for his kind help in improving the English. The authors are indebted to two anonymous referees that greatly improved a preliminary version of the manuscript.

Figures legends

Figure 1 : History of *T. solanivora* invasion and location of sampling sites. Black arrows represent the invasion steps in Central and South America and to the Canary Islands, with the date of first observation of the pest in each country. Black squares in the central map represent localities. Details in inserts: each black circle represents sampling localities or a group of neighbouring localities, numbers are locality IDs (see Table 1), the size of each circle is proportional to the number of individuals sampled in each locality. Black bars in each map equal 200 km

Figure 2 : Cytochrome b haplotypes 95% statistical parsimony network. The black circles correspond to missing haplotypes and the numbers of the corresponding localities are given for each haplotype

Figure 3 : Plots of the invaded/native ‘genetic diversity ratio’ as a function of the invaded/native ‘sample size ratio’ for both mitochondrial (A) and microsatellite markers (B). Number for each plot refers to column 1 of Table 2. Zone D: higher variability in invaded range. Zone H: higher variability in native range. D⁺ and H⁺: high reliability of the conclusion. D⁻ and H⁻: low reliability of the conclusion. Full dot: *Tecia solanivora*

Figures

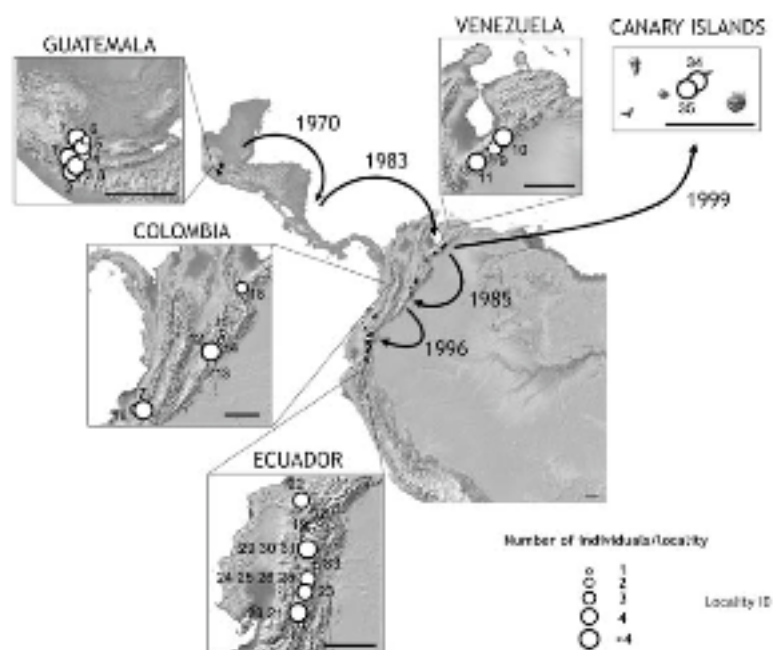


Figure 1

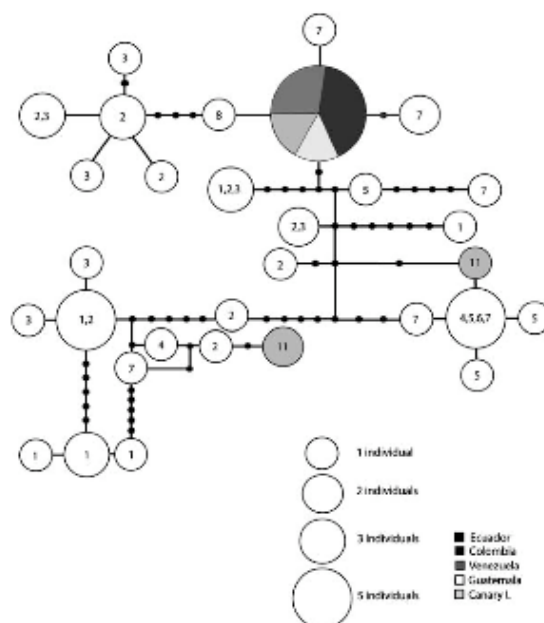


Figure 2

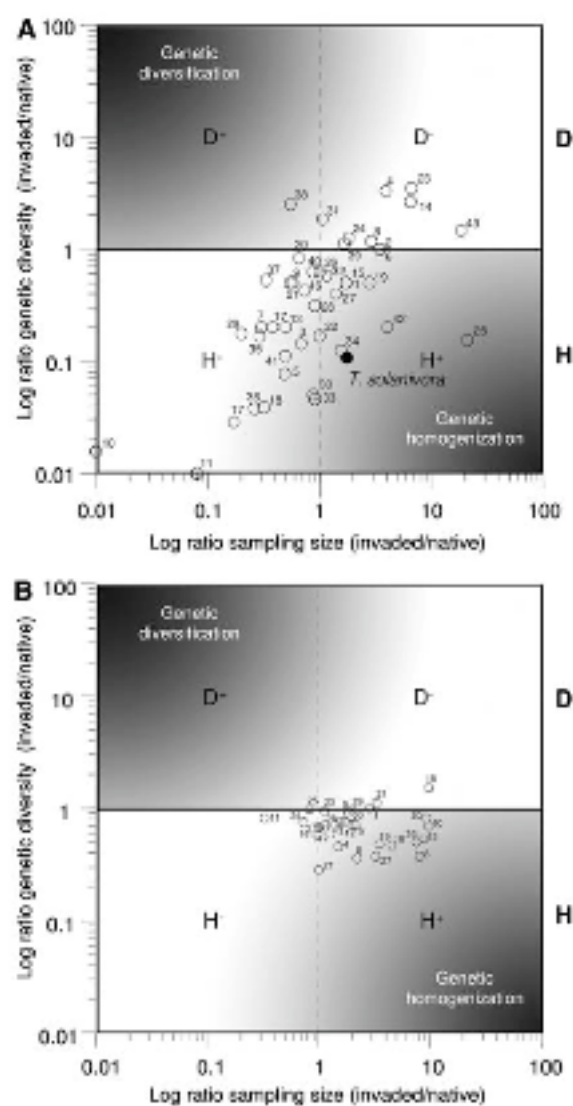


Figure 3

Tables

Table 1: Name and latitude and longitude of sampling sites, with number of sampled individuals

ID	Country	Locality	Coordinates	Individuals
1	Guatemala	Madre Selva	15° 01' 54" N 91° 47' 66" W	10
2		Concepcion	14° 51' 46" N 91° 37' 32" W	13
3		ICTA	14° 52' 24" N 91° 30' 82" W	7
4		Patío De Bolas	15° 22' 95" N 91° 26' 43" W	3
5		Nueva Esperanza	15° 26' 24" N 91° 27' 84" W	4
6		Chichim 1	15° 33' 12" N 91° 24' 02" W	2
7		Chichim 2	15° 34' 08" N 91° 34' 58" W	6
8		La Cumbre de San Juan	14° 52' 74" N 91° 39' 84" W	1
9	Venezuela	Mucuchies	08° 45' 32" N 70° 55' 33" W	3
10		Pilano	08° 55' 02" N 70° 39' 22" W	7
11		Pueblo Hondo	08° 16' 33" N 71° 51' 23" W	6
12	Colombia	Tibaitata 1	04° 42' 00" N 74° 12' 00" W	8
13		Tibaitata 2	04° 00' 00" N 74° 12' 00" W	1
14		El Tejar	05° 07' 60" N 73° 39' 00" W	1
15		Vereda	05° 13' 60" N 73° 33' 00" W	1
16		San Marcos	01° 51' 00" N 77° 40' 60" W	2
17		Los Cedros	01° 54' 00" N 77° 34' 00" W	5
18		Chitaga	07° 22' 00" N 72° 39' 00" W	3
19	Ecuador	Quito	00° 13' 27" S 78° 31' 16" W	1
20		La Posta	02° 31' 53" S 78° 56' 28" W	6
21		Zisho	02° 31' 57" S 78° 56' 23" W	3
22		San Jose	00° 32' 14" N 78° 57' 29" W	6
23		Quimag Riobamba 1	01° 51' 17" S 78° 40' 26" W	4
24		Quimag Riobamba 2	01° 38' 16" S 78° 33' 48" W	1
25		Riobamba	01° 39' 27" S 78° 33' 42" W	1
26		Mercado Riobamba	01° 39' 27" S 78° 33' 43" W	1
27		Quimag Riobamba 1	02° 42' 45" S 78° 45' 32" W	1
28		Quimag Riobamba 2	01° 39' 31" S 78° 33' 42" W	1
29		Anchilibi 1	01° 02' 96" S 78° 34' 61" W	3
30		Anchilibi 2	01° 02' 58" S 78° 33' 43" W	1
31		LaHoya	01° 00' 62" S 78° 34' 50" W	1
32		Patain Santa Ana	00° 08' 06" S 78° 19' 13" W	1
33	Canary Islands	Santaana	01° 19' 60" S 78° 26' 06" W	1
34		Los Realejos	28° 22' 00" N 16° 36' 00" W	6
35		ICOD	28° 23' 00" N 16° 34' 00" W	6

Table 2: Results of the bibliographic search (43 articles using mitochondrial markers and 29 articles using microsatellites, listed by taxon). For each quoted paper, the species, the molecular marker used, the native and invaded ranges, the genetic diversity for both ranges with the number of haplotypes or mean number of alleles/loci and the number of sampled individuals, the authors and the year of publication are indicated. The number in column 1 can be used to locate the corresponding article data on Fig. 3a and 3b.

No	Taxon	Species	Marker	Native Range (NR)	Invaded Range (IR)	Variability NR	Sampling NR	Variability IR	Sampling IR	Authors
1	Alga	<i>Codium fragile</i>	cpDNA	Japan	USA, Europe, South Pacific	2	32	1	55	Provan et al. 2005
2	Ascidian	<i>Clavelina lepadiformis</i>	COI	Atlantic	Mediterranean harbours	3	10	3	35	Turon et al. 2003
3	Crustacean	<i>Cercopagis pengoi</i>	ND5	Black sea	North America, Baltic sea	7	32	1	22	Cristescu et al. 2001
4	Crustacean	<i>Chthamalus proteus</i>	COI	West Atlantic	Pacific	49	53	162	207	Zardus and Hadfield 2005
5	Crustacean	<i>Echinogammarus ischnus</i>	COI	Europe	Rhin river, Great Lakes	13	41	1	20	Cristescu et al. 2004
6	Crustacean	<i>Eriocheir sinensis</i>	COI	Asia	Europe	5	22	5	76	Hänfling et al. 2002
7	Crustacean	<i>Eriocheir sinensis</i>	COI	Europe	North America	5	76	1	23	Hänfling et al. 2002
8	Fish	<i>Acanthogobius flavimanus</i>	CR	East Asia	California	42	55	49	161	Neilson and Wilson 2005
9	Fish	<i>Atherinomorus lacunosus</i>	D-loop	Red sea	Mediterranean sea	20	22	10	12	Bucciarelli et al. 2002
10	Fish	<i>Forsterygion lapillum</i>	CR	New-Zealand	Australia	64	151	1	1	Hickey et al. 2004
11	Fish	<i>Forsterygion varium</i>	CR	New-Zealand	Australia	174	188	1	15	Hickey et al. 2004
12	Fish	<i>Grahamina gymnota</i>	CR	New-Zealand	Australia	70	70	2	12	Hickey et al. 2004
13	Fish	<i>Gymnocephalus cernuus</i>	CR	Eurasia	Great Lakes	5	48	1	24	Stepien et al. 1998
14	Fish	<i>Hybognathus placitus</i>	ND4	Canadian and Red rivers (Oklahoma)	Pecos river (New-Mexico)	11	65	29	424	Moyer et al. 2005
15	Fish	<i>Neogobius melanostomus</i>	CR	Europe	North America	12	23	6	40	Dillon and Stepien 2001
16	Fish	<i>Neogobius melanostomus</i>	Cyt b	Eurasia	Great Lakes	7	69	3	51	Stepien and Tumeo 2006
17	Fish	<i>Petromyzon marinus</i>	CR	Lake Superior	Lake Ontario, rivers east of the lake	10	136	2	52	Waldman 2004
18	Fish	<i>Poecilia reticulata</i>	CR	South America	Australia	52	128	2	41	Lindholm et al. 2005

No	Taxon	Species	Marker	Native Range (NR)	Invaded Range (IR)	Variability NR	Sampling NR	Variability IR	Sampling IR	Authors
19	Fish	<i>Proterorhinus marmoratus</i>	Cyt b	Eurasia	Great Lakes	6	11	3	31	Stepien and Tumeo, 2006
20	Fish	<i>Siganus luridus</i>	Cyt b	Red sea	Mediterranean sea	6	76	5	50	Hassan et al. 2003
21	Fish	<i>Siganus rivulatus</i>	Cyt b	Red sea	Mediterranean sea	6	87	3	50	Hassan et al. 2003
22	Insect	<i>Aceria guerreronis</i>	16S	America	Africa, India, Sri Lanka	6	14	1	14	Navia et al. 2005
23	Insect	<i>Aedes albopictus</i>	ND5	Asia	America	2	80	7	534	Birungi and Munstermann, 2002
24	Insect	<i>Aedes japonicus</i>	ND4	Japan	New-Zealand, USA	8	29	10	53	Fonseca et al. 2001
25	Insect	<i>Aethina tumida</i>	COI	Afrique	North America	13	25	2	533	Evans et al. 2003
26	Insect	<i>Bactrocera oleae</i>	NADH	Africa	America	8	20	5	20	Nardi et al. 2005
27	Insect	<i>Ceutorhynchus obstrictus</i>	COI	Europe	North America	10	73	4	103	Laffin et al. 2005
28	Insect	<i>Daktulosphaira vitifoliae</i>	COI	North America	Rest of the world	64	76	20	69	Downie 2002
29	Insect	<i>Dendroctonus valens</i>	COI	America	China	120	174	21	35	Cognato et al. 2005
30	Insect	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	COL/COII	USA	Europe	20	58	1	51	Grapputo et al. 2005
31	Insect	<i>Linepithema humile</i>	Cyt b	South America	Europe, USA, Australia	7	15	13	16	Tsutsui et al. 2001
32	Insect	<i>Liriomyza sativae</i>	COI	America	Old World	19	51	11	59	Scheffer and Lewis 2005
33	Insect	<i>Megastigmus transvaalensis</i>	COI	Africa	America	22	24	1	22	Scheffer and Grissell 2003
34	Insect	<i>Papilio demoleus</i>	COI	Asie	Dominican Republic	8	18	1	28	Eastwood et al. 2006
35	Insect	<i>Tetramorium trushimae</i>	COI	Asia	USA	12	24	2	7	Steiner et al. 2006
36	Mollusc	<i>Arion subfuscus</i>	16S	Europe	North America	53	840	2	219	Pinceel et al. 2005
37	Mollusc	<i>Brachidontes pharaonis</i>	COI	Red sea	Mediterranean sea	59	193.5	31	64.5	Shefer et al. 2004
38	Mollusc	<i>Cyclope neritea</i>	COI	Medit. and Black seas, Iberian Peninsula	France Atlantic coasts	2	60	5	33	Bachelet et al. 2004

No	Taxon	Species	Marker	Native Range (NR)	Invaded Range (IR)	Variability NR	Sampling NR	Variability IR	Sampling IR	Authors
39	Mollusc	<i>Melanoides tuberculata</i>	12S/16S	Africa, Asia, Australia	America	8	21	9	35	Facon et al. 2003
40	Mollusc	<i>Ocenebrellus inornatus</i>	COI	Asia	Europe, USA	24	49	15	43	Martel et al. 2004
41	Mollusc	<i>Potamopyrgus antipodarium</i>	16S	New-Zealand	Europe	18	65	2	32	Stadler et al. 2005
42	Plant	<i>Schinus terebinthifolius</i>	cpDNA	South America	USA	10	87	2	354	Williams et al. 2005
43	Plant	<i>Silene vulgaris</i>	cpDNA	Europe	North America	13	28	19	520	Mc Cauley et al. 2003
1	Alga	<i>Codium fragile</i>	Microsatellites	Japan	USA, Europe, South Pacific	1.143	71	1.143	206	Provan et al. 2005
2	Bird	<i>Carpodacus mexicanus</i>	Microsatellites	West USA	East USA	16.4	105	10.8	117	Hawley et al. 2006
3	Crustacean	<i>Bythotrephes longimanus</i>	Microsatellites	Italy, Switzerland, Finland	Great Lakes	4.467	90	3.36	139.7	Colautti et al. 2005
4	Fish	<i>Monopterus</i>	Microsatellites	Asia	USA	11	27	5	41	Collins et al. 2002
5	Fish	<i>Petromyzon marinus</i>	Microsatellites	Lakes Ontario, Champlain, Cayuga	Other Great Lakes	3.38	190	3.088	351	Bryan et al. 2005
6	Fish	<i>Poecilia reticulata</i>	Microsatellites	South America	Australia	9.4	39	3.514	314	Lindholm et al. 2005
7	Fungus	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	Microsatellites	East USA	California, Europe	3.75	29	2.625	33	Engelbrecht et al. 2004
8	Insect	<i>Ceratitidis capitata</i>	Microsatellites	Africa	Mediterranean sea	12.25	47	4.4	104	Bonizzoni et al. 2004
9	Insect	<i>Ceratitidis capitata</i>	Microsatellites	Mediterranean sea	Australia	4.4	104	3.13	222	Bonizzoni et al. 2004
10	Insect	<i>Ceratitidis capitata</i>	Microsatellites	Kenya	Latin America	5.59	20	3.88	196	Bonizzoni et al. 2001
11	Insect	<i>Ceratitidis capitata</i>	Microsatellites	Latin America	California	3.88	196	3.17	64	Bonizzoni et al. 2001
12	Insect	<i>Ceratitidis rosa</i>	Microsatellites	South of Africa	Mauritius and Réunion Islands	5.55	89	4.158	158	Baliraine et al. 2004
13	Insect	<i>Drosophila subobscura</i>	Microsatellites	France	North America	7.5	15	4	132.375	Noor et al. 2000

No	Taxon	Species	Marker	Native Range (NR)	Invaded Range (IR)	Variability NR	Sampling NR	Variability IR	Sampling IR	Authors
14	Insect	<i>Linepithema humile</i>	Microsatellites	North & South Carolina, Georgia	California	0.649	240	0.436	240	Buczowski et al. 2004
15	Insect	<i>Polistes dominulus</i>	Microsatellites	Europe	USA	5.308	8	8.077	79	Johnson and Starks 2004
16	Insect	<i>Reticulitermes santonensis</i>	Microsatellites	Oléron Island	Paris	4.7	430	3.1	390	Dronnet et al. 2005
17	Insect	<i>Wasmannia auropunctata</i>	Microsatellites	French Guiana	New Caledonia	10.364	30	2.917	30	Fournier et al. 2005
18	Mammal	<i>Rattus norvegicus</i>	Microsatellites	Brittain (mainland)	Britain (islands)	7.9	21.9	3.7	100.2	Calmet et al. 2001
19	Mammal	<i>Rattus rattus</i>	Microsatellites	Guadeloupe Island	Petite Terre, Fajou	5.375	59	2.566	207	Abdelkrim et al. 2005
20	Mollusc	<i>Dreissena polymorpha</i>	Microsatellites	Romania	Great Lakes, Netherlands, Ireland	15.2	30	12.4	278.8	Astaneu et al. 2005
21	Mollusc	<i>Dreissena rostriformis</i>	Microsatellites	Northern Black sea	Volga river, Caspian, Great lakes	15.556	97.15	17.35	323.85	Therriault et al. 2005
22	Mollusc	<i>Lymnaea trunculata</i>	Microsatellites	Europe, Maroc	Bolivia	1.4	122	1	245	Meunier et al. 2001
23	Mollusc	<i>Perna perna</i>	Microsatellites	South Maerica, Africa	Gulf of Mexico	25.5	194	24.165	219	Holland 2001
24	Plant	<i>Alliaria petiolata</i>	Microsatellites	Europe	North America	1.9	315	1.42	234	Durka et al. 2005
25	Plant	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	Microsatellites	USA	France	9	360	8.8	300	Genton et al. 2005
26	Plant	<i>Bryophyllum delagoense</i>	Microsatellites	Madagascar	Australia	6.889	12	3.444	91	Hannan-Jones et al. 2005
27	Plant	<i>Schinus terebinthifolius</i>	Microsatellites	South America	USA	11.8	108	4.4	354	Williams et al. 2005
28	Plant	<i>Spartina alterniflora</i>	Microsatellites	Atlantic coast	Willapa Bay	4.364	12.09	3.09	17.18	Blum et al. 2004
29	Stramenopile	<i>Undaria pinnatifida</i>	Microsatellites	Asia	New-Zealand & France	2.47	24	2.375	48	Daguin et al. 2005

Inferring native range and invasion scenarios with mitochondrial DNA: the case of *T. solanivora* successive stepping-stone introductions in Central and South America

Soumis à Biological Invasions

M. Torres-Leguizamón^{1*}, S. Dupas^{1,2}, D. Dardon³, Y. Gómez⁴, L. Niño⁵, A. Carnero⁶, A. Padilla⁶, A. Fossoud¹, I. Merlin¹, C. Capdevielle-Dulac¹, J-L. Zeddami¹, X. Lery¹, O. Dangles^{1,2}, and J-F Silvain¹

¹ IRD, Institut de Recherche pour le Développement, UR 072, Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation, UPR 9034, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), 91198 Gif sur Yvette Cedex, France et Université Paris-Sud 11, 91405 Orsay Cedex, France.

² IRD, Institut de Recherche pour le Développement, UR 072, Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), Laboratorio de Bioquímica y Microbiología molecular, Quito, Ecuador.

³ ICTA, Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas, programa de plantas y animales, Villa Nueva, Guatemala.

⁴ INTA, Instituto Nacional de Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria, San José, Costa Rica.

⁵ INIA, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Laboratorio de entomología, Mérida, Venezuela.

⁶ ICIA, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, Departamento de protección vegetal, La laguna, Islas Canarias.

* Corresponding author: magally.torres@legs.cnrs-gif.fr, telephone number +33 0169824251, Fax +33 0169823736

Introduction

The accurate identification of the area of origin of invading populations and the genetic analyses of the source populations, as well as the study of the genetic changes experienced by invasive species during the colonization process, are useful to better understand biological invasions and the mechanisms that allow establishment and spread in a newly colonized area (Sakai *et al.* 2001; Wares *et al.* 2005; Dlugosch & Parker 2008). In this context, mitochondrial DNA has proven useful to determine area of origin in case of population structure (Cognato *et al.* 2005; Pulliandre *et al.* 2008; Wang *et al.* 2009). Regarding the reconstitution of invasion history, mitochondrial DNA was used with success to reveal recent bottleneck experienced by a wide array of invaders and to tackle questions about the genetic paradox of biological invasions (Frankham 2005; Golani 2007; Puillandre *et al.* 2008). It was also used to demonstrate hybridization and multiple origins in invasive populations (Simon-Bouhet 2006).

Information about the ecology and genetics of source populations of invasive species is crucial to understanding the determinants of invasion dynamics of those species (Sakai *et al.* 2001; Bossdorf *et al.* 2005; Pedersen *et al.* 2006). This knowledge could also be used to improve the effectiveness of pest management programs in the invaded area (Cognato *et al.* 2005). For example an inventory of biological control agents, such as entomophagous insects or viruses that reduce the population levels of an invasive species in its area of origin and identification of the developmental stages during which that species is more susceptible to pathogens or parasitoids could potentially improve the development of effective biological controls (Roderick & Navajas 2003; Baliraine *et al.* 2004). Circumscribing the native range could be also useful to characterize phenotypic attributes that may be related to evolutionary changes associated with introduction and invasion success (Ahern *et al.* 2009). Finally the

identification of the source population of an introduction reduces the potential for making false inferences about the nature and magnitude of evolutionary changes during introductions and invasions (Kolbe *et al.* 2004).

T. solanivora (Povolny, 1973) is an invasive species that attacks the tubers of the potato *S. tuberosum* L. Adults are nocturnal and present a sexual dimorphism (males are smaller than females). The females usually lay eggs at the bottom of the potato stems in the fields and on the ground or on uncovered tubers in storerooms. The emerging larvae feed inside the potato tubers where they build galleries leading from partial to complete tuber destruction. The pupae can develop within tuber, in the ground or in bags in the storerooms (Niño 2004). The pest was reported for the first time in Guatemala in 1956 (Gómez 2008; Niño 2004) when the Inter-American Cooperative Service for Agricultural Development (SCIDA), in charge of potato cultivation improvement first observed the damage caused by a small lepidopterous mite pest in potato crops (Torres 2003). To improve local production between 1958 and 1962 the Guatemalan government created the agency for the control and certification of potato seeds. In 1967 and 1968 most of the certificated potato seeds produced in Quetzaltenango region of Guatemala, were exported to Central American countries, especially to Honduras and Costa Rica (Cifuentes 1980; Christiansen 1980). In the 70's the potato production in Guatemala increased thanks to the implementation of new agronomic practices and most of the potatoes production was exported to Central American countries (94.74% and 67.71% of the total production in 1970 and 1971 respectively (ICTA 1977). At the same time the presence of *T. solanivora* was reported in other Central American countries. In 1970, most of the potato crops in Costa Rica were destroyed by the species (Murillo 1980). In 1973 *T. solanivora* was described for the first time from moths and larvae collected in Costa Rica (Povolny 1973), in the same year the pest was recorded in Panama where it caused

20% losses of the potato crops. It is possible that increase of commercial exportation was responsible for the expansion of *T. solanivora* populations in these countries during this period. The species was also observed in Honduras where it infected 350ha, in 1982. At this time there were no records of the pest in Salvador, Nicaragua, Mexico or the Dominican Republic (Murillo 1982). In 1989 the pest is reported in Nicaragua (Leal 1989). In the 80's, in parallel with the extension of field irrigation, significant pest damages were reported in Guatemala (Ruano *et al.* 1984); they were not as important as those reported in other countries at the same time however. The presence of natural enemies possibly helped to control the pest in Guatemala (Giron 1984).

In Venezuela at the end of 1983 the importation of infected seeds from Costa Rica was reported (Salazar & Escalante 1984; Torres 2003; Niño 2004); in 1985 the species reached the border area between Venezuela and Colombia and began to colonize the central and southern zone of that country (Rincon and Lopez-Avila 2004). In 1996 *T. Solanivora* was reported in Ecuador in the Colombian neighboring zone (Gallegos *et al.* 1997). Finally in 1999 the presence of the species was recorded in the Canary Islands (Niño 2004) where an illegal importation of one bag of infested potatoes from South America has been reported (EPPO 2006). No accurate information is available about the geographic origin of the Canary Islands' populations; nevertheless it is thought that the species was introduced illegally with potatoes from Venezuela, Colombia or Ecuador. *T. solanivora* is now reported as a serious pest on potato crops and stocks in countries where it is present (EPPO 2006).

The analysis of 127 individuals of *T. solanivora* in a recent study (Puillandre *et al.* 2008) has demonstrated the utility of Mitochondrial DNA to detect the genetic diversity loss during the invasion process, the authors showed that the bottleneck(s) experienced by the

species during its invasion phase was one of the most important described in the literature. In the present work, we sequenced 541 individuals in order to (i) delimitate the area of origin of the species, (ii) analyze the genetic structure of *T. solanivora* in its native zone, (iii) describe the genetic changes of populations of the species during colonization process. Although we specifically focus on *T. solanivora* in this paper, our approach is useful to test the efficiency of the cyt b marker in delimiting the area of origin of an insect invasive species, as well as in describing the invasion and the genetic changes which occur in invasive populations during the colonization process. This approach could be useful especially for invasive lepidopteran species for which the development of molecular markers such as microsatellites is a very difficult task (Meglécz *et al.* 2007).

Materials and methods

Bibliographic historical research

The knowledge of the invasion history of a pest can give some insight into the invasion process. In order to better describe the *T. solanivora* invasion, we collected most of the governmental information available about the colonization process of the species. This information was obtained from ICTA in Guatemala, INTA in Costa Rica, INIA in Venezuela and ICIA in Canary Islands. Detailed information (see the introduction) was later compared with the results of the genetic analysis using the cytochrome b (cyt b) marker.

Collection of samples and study sites

One of the difficulties of this kind of study, when tropical species are concerned, is to obtain samples from all the countries involved. We established a standard protocol using pheromone traps to capture representative populations from almost all the countries where the

species have been observed. In Guatemala (the putative native area of the species) we sampled at 8 localities in two regions: Huehuetenango and Quetzaltenango, corresponding to the northern and southern branches of the Sierra Madre mountains. Between 3 and 7 sites were sampled in the other countries analyzed: Costa Rica, Venezuela, Colombia, Ecuador and the Canary Islands. A total of 541 individuals were collected and sequenced (see Table 1). The samples were preserved in 95% ethanol prior to molecular analysis.

DNA extraction and amplification

Genomic DNA samples were extracted using the DNeasy Tissue Kit (Qiagen). We used the thorax from *T. solanivora* individuals from all the countries sampled. The remaining body parts were stored in 95% ethanol. A fragment of the Mitochondrial gene, cytochrome b (cyt b) (770 base pairs) was amplified by polymerase chain reaction. We designed specific primers for the species using PRIMER3 software (Rozen & Skaletsky 2000). PCR reactions with Primer TsF1 (5'-GCTAAYATTGARTTAGCTTTTAT-3') and TsR (5'-AAAAATTAGRGTTATCTCAAAT-3') were performed using a Biometra T1 Thermal cycler with an initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of the three following steps: denaturation at 94°C for 1min, annealing at 59°C for 1 min 30 s and extension at 72°C for 1 min 30 s. The final extension was done at 72°C for 5 min. Each amplification (25µl) contained 1 µl of DNA, 5µl of reaction buffer 5X, 3µl of MgCl₂ 25 mM, 0.6µl dNTP 10 mM, 1µl of each primer at 10 mM and 1 unit of Taq polymerase (Promega). PCR products were purified using the PCR clean up system (Promega). Fragments were sequenced on both DNA strands with the ABI Prism 3130 automatic sequencer using the Big-Dye Terminator Sequencing Kit (Both from Applied Biosystems). Sequences were deposited in GenBank (Accession numbers: GU056361-GU056780).

Data analyses

Sequences were aligned manually with MacClade 4.07 (Maddison & Maddison 2000). Haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (π) and the number of polymorphic sites within each population from the supposed origin and invaded areas were calculated using ARLEQUIN version 3.01 (Excoffier *et al.* 2005).

To describe the genetic relationships between haplotypes, a haplotype network was constructed based on statistical parsimony (Templeton *et al.* 1992) using the program TCS 1.21 (Clement *et al.* 2000). We used a network approach because it is considered more adapted than traditional phylogenetic methods to represent genealogical relationships at a population level (Clement *et al.* 2000). Traditional treelike methods make assumptions that are not adequate at a population level: they assume that ancestral haplotypes are no longer in the population, moreover those methods need a large number of variable characters to reconstruct relationships, but sequence variation is usually low at a population level (Clement *et al.* 2000). Network methods are developed based on population genetic statistical calculations for the connections between neighboring haplotypes, which allows recombination and the occurrence of ancient haplotypes in the present-day population.

To analyze the population structure of *T. solanivora* and to clarify the origin area and the invaded region of the species, we used different approaches: we used molecular variance analysis (AMOVA) to test the population structure of the species in its reported area of origin (Guatemala). We considered the distribution of the species in this area to define population groups: the first one brings together the populations belonging to the Huehuetenango region and the second group the populations from the Quetzaltenango region in Guatemala. In order to estimate whether Costa Rica is part of the native or into the invaded range, we performed three more analyses: in the first one Guatemala, Costa Rica and the remaining invaded

countries were considered as three different groups; in the second one we considered Costa Rica as part of the area of origin and finally in the third one we assumed that Costa Rica was part of the invaded area.

To complete our analysis we performed a spatial analysis of molecular variance (SAMOVA), the goal of this method is to identify a group structure based solely on genetic data. The populations are assigned to k (1, 2, 3, n...) groups with the constraint that populations within a group must be geographically adjacent and genetically homogeneous (Dupanloup *et al.* 2002). The clustering giving the highest Φ_{ct} value is retained. Finally we calculated pairwise $\Phi_{ST}^{-values}$. The AMOVA and the pairwise $\Phi_{ST}^{-values}$ were calculated using ARLEQUIN version 3.01 (Excoffier *et al.* 2005) and the SAMOVA with SAMOVA 1.0 (Dupanloup *et al.* 2002).

In order to analyze demographic changes in populations we tested deviations of Tajima's D, Fu's F_s and R_2 statistics from null hypothesis, assuming that these deviations were due to demographic but not selective effects. Tajima's D (Tajima 1989) (based on the difference between two alternative estimates of the mutational parameter $\theta = 2Nu$, where N is the effective number of gene copies in the population and u is the mutation rate) Fu's F_s test (Fu 1997) (based on the probability of having a number of haplotypes greater or equal to the observed number of samples drawn for a constant sized population) and the R_2 statistics (Ramos-Onsins & Rozas 2002) statistics (based on the difference between the number of singleton mutations and the average number of nucleotide differences), in order to complete the analyses, we examined the mismatch distribution (based in the analysis of the distribution of pair-wise differences). Calculations were performed using ARLEQUIN version 3.01 (Excoffier *et al.* 2005) and DnaSP version 4.0 (Rozas *et al.* 2003).

Results

Genetic Diversity

A 770 bp fragment of the cyt b gene has been sequenced and analyzed from a total of 541 individuals of *T. solanivora*: 177 from the putative native area (Guatemala), and 364 individuals from the remaining countries (table 1).

A total of 60 haplotypes were found, showing 60 polymorphic sites: 50 haplotypes in Guatemala, and 15 haplotypes in the rest of the sampled countries. The putative area of origin exhibited 58 polymorphic sites, and 30 polymorphic sites were found in the remaining countries.

Populations from Guatemala displayed high levels of haplotype and nucleotide diversity ($h = 0.914$) and ($\pi = 0.012$). Costa Rica and Venezuela displayed a successive loss of haplotype ($h = 0.392$ and $h = 0.169$, respectively) and nucleotide diversity ($\pi = 0.004$ and $\pi = 0.0018$, respectively). They showed also a reduction in the number of haplotypes. Only one particular haplotype was present in all populations from Colombia, Ecuador and Canary Islands (Table 1).

Population genetic structure

The relationships between mitochondrial haplotypes found in the distribution area (both native and introduced ranges) of *T. solanivora* are presented in the haplotype network. The two most common haplotypes in Guatemala, namely H1 and H2, were both found in Costa Rica, and in Costa Rica and Venezuela respectively. Three more haplotypes displayed in Guatemala (H3, H4, H5) were also found in Costa Rica. All the individuals sampled in Colombia, Ecuador, and Canary Islands had the same haplotype (H6). This haplotype was the most common one displayed in Costa Rica and Venezuela. It has not been found in

Guatemala, besides it is closely related to Guatemala haplotypes. Two haplotypes (H7, H8) were shared by Venezuela and Costa Rica and six unique haplotypes were found in the introduced area, five in Costa Rica (H9, H10, H11, H12, H13) and one in Venezuela (H14) (fig 1B).

The network built using only the haplotypes found in Guatemala showed high haplotype diversity. This diversity was geographically structured with only four haplotypes shared between the two sampled regions (H3, H15, H16, H17). Some of the rare haplotypes were linked to the three more common haplotypes by one step mutation (fig 1A).

AMOVA performed on Guatemalan samples showed a significant variation between regions (9.26% of the variance explained). The genetic differentiation within populations showed significant sample differentiation, with 87.75% of the variation explained by the variation between individuals. Results of the AMOVA made in order to define the invaded area, assigned Costa Rica to the invaded zone as substantial differentiation among groupings was observed when we included Costa Rica into the colonized area (Table 2).

The spatial analysis of molecular variance SAMOVA (Table 3) showed that the highest significant value ($\Phi_{CT}=0.49002$) was obtained when the populations were grouped into five clusters. For $k=5$ the populations from the supposed area of origin were clustered into four groups: all populations belonging to the Quetzaltenango region clustered together (Gu4, Gu5, Gu6, Gu7 and Gu8) and all the populations from the Huehuetenango region clustered separately (Gu1), (Gu2), and (Gu3). The fifth cluster grouped together the populations from the remaining countries (Costa Rica, Venezuela, Ecuador, Colombia and Canary Islands). Costa Rica always clustered into the invaded area group independently of the number of fixed clusters.

Pairwise Φ_{ST}^{values} between Guatemalan populations showed non significant Φ_{ST}^{values} from Quetzaltenango Gu4, Gu5, Gu6, Gu7 and Gu8 populations. All pairwise Φ_{ST}^{values} between populations from the Guatemala and those of the remaining countries were highly significant (table 4). The genetic differentiation increases as the invasion process expands: Guatemala-Costa Rica (Φ_{ST}^{values} ranged between 0.38-0.49); Guatemala-Venezuela (Φ_{ST}^{values} ranged between 0.46-0.7); Guatemala- (Colombia, Ecuador and Canary Island) (Φ_{ST}^{values} ranged between 0.66-0.95). The Φ_{ST}^{value} between Costa Rica and Venezuela was lower than the Φ_{ST}^{values} between Costa Rica and the remaining invaded countries.

The lowest pairwise Φ_{ST}^{values} between populations of Guatemala and populations of the other countries was found between populations Gu5 and Costa Rica ($\Phi_{ST}^{value}= 0,38$); Gu5 and Venezuela ($\Phi_{ST}^{value}= 0,46$) and Gu5 and (Colombia, Ecuador and Canary Islands) ($\Phi_{ST}^{value} = 0.66$). There was a gap between the Gu5-Costa Rica distance and the other distances that constituted a monomodal Φ_{ST} distribution curve.

Historical demography

Both Tajima's D and Fu's neutrality tests showed no significant values for the populations from Guatemala (table 5). The same tests displayed significant negatives values for the whole invaded zone including Costa Rica. Those results which suggest population expansion in the colonized area, and a demographic equilibrium in the native range are supported by our mismatch distribution analyses. The distribution for Guatemala consisted in a multimodal curve (data not shown). The values of R2 test were also lower in the colonized area, as expected after a recent strong population growth event (Table 5).

Discussion

Limits of *T. solanivora* native range

Although *T. solanivora* has been reported to be native from Guatemala, little information was available about the status, native or invasive, of the pest in the remaining countries of Central America. This potato moth was observed in Honduras, Salvador, Costa Rica (where it was described), Panama and Nicaragua. Our data analysis of *T. solanivora* populations from two countries of Central America (Guatemala and Costa Rica), confirms Guatemala as the area of origin of the species. Native populations generally display higher levels of genetic diversity compared to introduced populations (Puillandre *et al.* 2008; Dlugosch & Parker 2008). This is the case for all Guatemalan populations analyzed in this study. Analyses of Costa Rican populations indicate that this country is part of the invasion range of the species: Costa Rican populations indeed experienced a marked loss of genetic diversity when compared with populations from Guatemala. This loss of genetic diversity is also revealed for Venezuela, and for Colombia, Ecuador and the Canary Islands that whose *T. solanivora* populations harbored only one haplotype. This pattern of genetically depauperated invasive populations have been observed before (Grapputo *et al.* 2005; De Walt & Hamrick 2004; Le Roux 2008; see also Puillandre *et al.* 2008); In addition the most common haplotype of Costa Rica and all South American populations was not found in Guatemala. This important change in haplotype distribution can be considered as a signature of a recent bottleneck event that occurred between Guatemala and Costa Rica.

The hypothesis of a Guatemalan origin of *T. solanivora* is also supported by the demographic analysis, which showed all Guatemalan populations being in demographic equilibrium rather than in expansion, whereas populations from Costa Rica and other countries exhibit genetic signature of population expansion. The AMOVA and SAMOVA

results also confirm that Costa Rica is part of the invaded countries. The highest Φ_{CT}^{Value} is observed when Costa Rica is included within the invaded area, and SAMOVA analysis always cluster Costa Rica within the invaded country population group. Those results are congruent with the historical data. The pest was indeed first observed in Costa Rica (Murillo 1980) during a period of increasing importation of potato seeds from Guatemala in the 70's (Cifuentes 1980; Christiansen 1980). Possibly a natural spread of the pest from Guatemala to Costa Rica could have been limited by the agro-ecological conditions in Salvador, Honduras and Nicaragua where potato is not intensively cultivated.

T. solanivora population structure in its native range

The AMOVA shows a significant differentiation between the two regions analyzed in Guatemala (Huehuetenango and Quetzaltenango), corresponding to the northern and southern branches of the Sierra Madre Mountain. The valley between those branches could limit the gene flow between these regions. Moreover only four haplotypes out of fifty found in Guatemala were shared between the two sampled regions.

SAMOVA results and pairwise Φ_{st}^{values} show that populations from Quetzaltenango are not significantly differentiated on the contrary of those of the Huehuetenango state. It is possible that the intensive potato commercial exchanges into the Quetzaltenango area allow greater population homogenization in Quetzaltenango region (Dardon, personal comm.).

The haplotype network shows the presence of a few dominant haplotypes in Guatemala, suggesting population equilibrium. This presence of dominant haplotypes and their recent closely related haplotypes is consistent with multimodal mismatch distribution (a few long branches and many short branches in the haplotype tree). And this is consistent with population equilibrium.

Genetic inferences on the colonization process

In some cases the analysis of genetic diversity across an introduced species' range can indicate the chronological order of colonization (Rollins *et al.* 2009), in our case, analysis of the different invaded country populations confirms a sequential colonization of *T. solanivora* from the area of origin to Costa Rica, Venezuela, Colombia, Ecuador and finally to Canary Islands. The progressive loss of genetic diversity observed between Guatemala and the invaded countries is consistent with a stepwise colonization of *T. solanivora*. The amount of diversity present in each country can be used to infer the order of colonization of the species (Kawamura *et al.* 2006). The Φ_{st}^{values} are also consistent with this sequence. The values observed between neighbouring countries were always lower than values between non-neighbouring countries in the sequence listed above. Those results are also congruent with the historical data collected: the species was first reported in Guatemala in 1956, after in Costa Rica in 1970, Venezuela in 1983, Colombia in 1985, and finally in Canary Islands in 1999.

(Puillandre *et al.* 2008) observed a major haplotype diversity loss in *T. solanivora* between Guatemala and Venezuela. The present study shows that the loss of diversity between Guatemala and Venezuela is due to at least two bottleneck events: the first one between Guatemala and Costa Rica and the second one between Costa Rica and Venezuela. Another bottleneck occurred between Venezuela and the countries that have been invaded later. This suggests that several demographic or selective sweep events occurred in the mitochondrial genome compartment during the invasion process. Loss of genetic variability between Guatemala and Costa Rica could be explained by an introduction of few individuals from Guatemala to Costa Rica, causing a strong bottleneck, or an introduction of a more important number of individuals followed by selection pressure leading to a reduction of the haplotype number. The high frequency of one particular haplotype in Costa Rica mimics the

situation observed in Guatemala and suggest a single introduction event in Costa Rica. In the case of multiple introductions, we may have expected the stochastic introduction of at least another major haplotype. A final bottleneck was detected between Venezuela and the remaining countries (as only one haplotype is present in this remaining area). Our result suggests a stepping-stone invasion scenario; resulting in a series of genetic bottlenecks as founders colonise new areas. As expected (Clegg *et al.* 2002; Hawley *et al.* 2008) genetic diversity declines progressively across the introduced range of the species (Wares *et al.* 2005).

The comparatively low Φ_{st}^{values} between Quetzaltenango Gu5 population and the populations of the invaded countries, as well as the inclusion of the Costa Rican haplotypes into the Guatemalan diversity suggest that the invaded populations from Costa Rica possibly originate from the Quetzaltenango region.

In each invaded country, the hypothesis of multiple introduction events appears less likely than a single introduction because of the successive bottlenecks observed at mitochondrial DNA level. This suggests that the cessation of importation had only been partly efficient to limit the spread of this species. The successive bottlenecks experiencing by *T. solanivora* during its colonization process, and the resulting reduction in genetic diversity however, did not impede its ecological success in Central America and Northern Andean countries. This paradox has been observed several times in the past (Sax *et al.* 2007; Mooney & Cleland 2001; Frankham 2005; Puillandre *et al.* 2008).

In our study mitochondrial DNA had been informative in delimiting the area of origin of *T. solanivora*, and also in analyzing the genetic structure of the species in its native zone. Cyt b has been used to reveal bottleneck events in the past but rarely multiple bottleneck

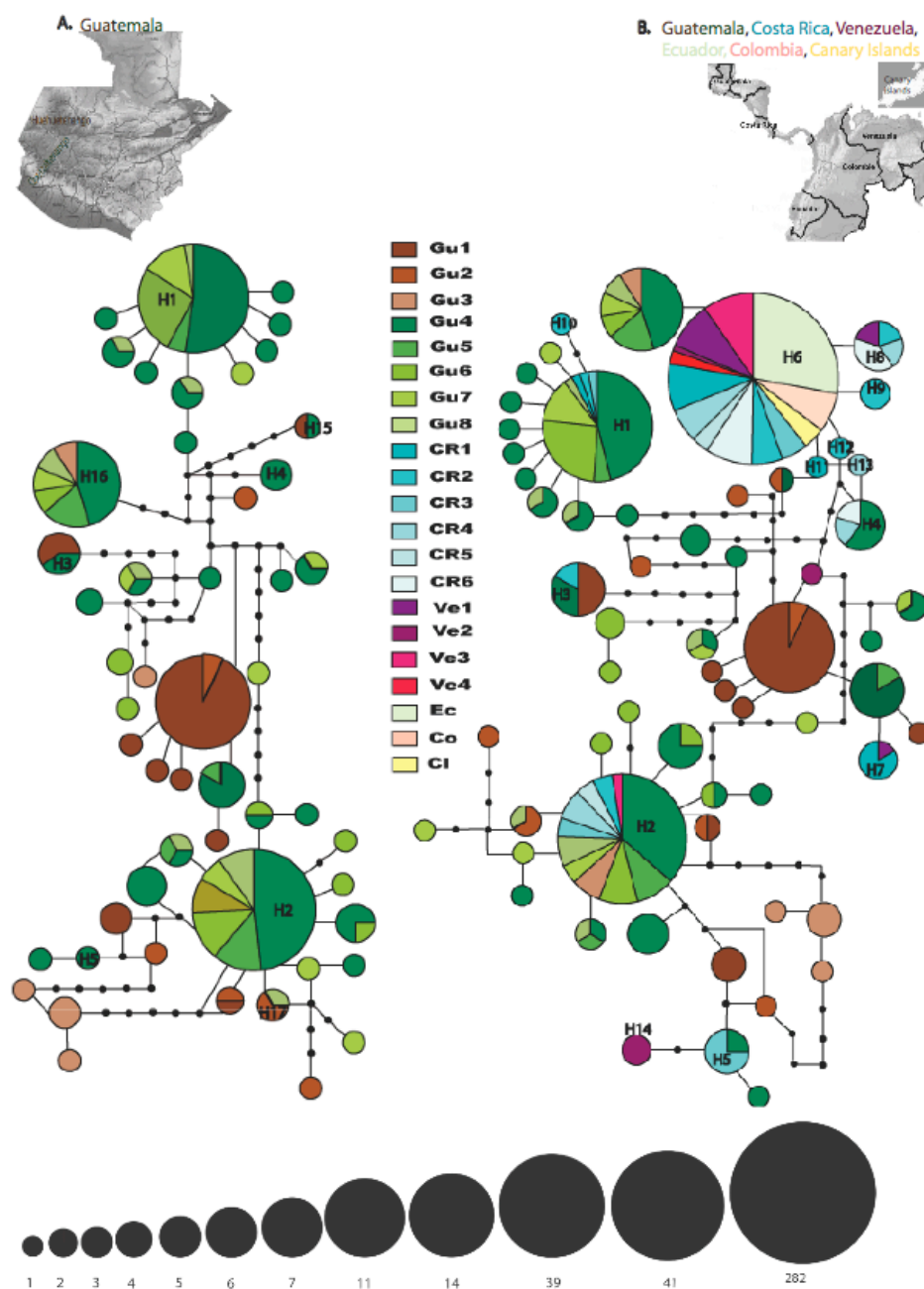
events as shown in the present work. Even if a comparison between other molecular markers is desirable, cyt b has confirmed the historical data collected about the invasion proving their utility inferring recent biological invasion scenarios.

Acknowledgements

The authors wants to thanks the Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas ICTA in Guatemala, especially the engineers Gustavo Tobar, Guillermo Chavez and Pedro Lacán and the agriculturalist Isabel López García; the Instituto Nacional de Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria INTA in Costa Rica; the Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas INIA in Venezuela, especially Alonso Antonio Arroyo; the Corporación Colombiana de Investigación agropecuaria CORPOICA in Colombia and the Instituto Canario de Investigaciones Agrarias ICIA in Canary Islands, for their help in collecting simples and for sharing information. Thanks to Daniel Couch, for his helpful comments and suggestions for improving the manuscript.

Figure

Fig 1: Cytochrome b haplotypes 95% statistical parsimony networks; A: Haplotype network from populations of two regions in Guatemala: Huehuetenango (brown colours) Quetzaltenango (green colours) B: Haplotype network from all countries: Guatemala, Costa Rica, Venezuela, Colombia, Ecuador, Canary islands. See simple sites in table 1.



Tables

Table 1: Genetic diversity of *T. solanivora*. Name and GPS coordinates of sample sites; N: sample size; Nhp: number of haplotypes; h: haplotype diversity; π : Nucleotide diversity; PS: numbers of polymorphic sites.

Code	Population	Country	Coordinates	N	Nhp	h	π	PS
Gu1	Paquix	Guatemala Huehuetenango region	15.63N 91.68W	30	10	0.784	0.007	26
Gu2	Chichim		15.56N 91.58W	9	8	0.972	0.013	27
Gu3	Madre Selva		15.03N 91.80W	10	6	0.867	0.011	25
Gu4	Concepcion 1	Guatemala Quetzaltenango region	15.00N 91.53W	73	25	0.885	0.012	40
Gu5	Concepcion 2		14.96N 91.78W	9	4	0.778	0.012	20
Gu6	Pachimacho		14.90N 91.60W	22	9	0.775	0.012	29
Gu7	Chiquira		14.86N 91.62W	14	9	0.879	0.011	24
Gu8	ICTA Xela		15.87N 91.52W	10	8	0.933	0.012	22
GuT	Guatemala all populations			177	50	0.914	0.012	58
CR1	Carlos Duran	Costa Rica	9.93N 83.81W	31	5	0.348	0.003	17
CR2	San Juan de Chicua		9.95N 83.85W	24	7	0.558	0.004	21
CR3	Potrero Cerrado		9.93N 83.88W	19	3	0.444	0.007	16
CR4	Santa Clara del Guarco		9.79N 83.95W	25	6	0.48	0.004	19
CR5	La fuente Paraizo		9.83N 83.86W	12	2	0.303	0.005	13
CR6	Macho Gaff	Costa Rica all populations	9.65N 83.94W	28	3	0.204	0.0004	4
CRT				139	13	0.392	0.004	30
Ve1	Llanetes Jauregui	Venezuela	8.25N 71.92W	27	3	0.145	0.0008	9
Ve2	Pueblo Hondo		8.27N 71.85W	6	3	0.733	0.0094	14
Ve3	La Toma Rangel		8.45N 70.53W	28	2	0.071	0.0012	13
Ve4	Pueblo Llano		8.91N	7	1	0	0	0

Table 2: Analysis of molecular variance (AMOVA) of cyt b sequences of *T. solanivora*; (Huehue): Huehuetenango, (Quetzal): Quetzaltenango, (GuT): Guatemala Total, (CRT): Costa Rica Total, (VeT): Venezuela Total, (CoT) Colombia Total, (EcT): Ecuador Total, (CIT): Canary Islands Total.

	Guatemala (Huehue) (Quetzal)	Grouping 1 (GuT) (CRT) (VeT,CoT, EcT,CIT)	Grouping 2 (GuT,CRT) (VeT,CoT, EcT,CIT)	Grouping 3 (GuT) (CRT,VeT,CoT, EcT,CIT)
Percentage of variation				
Among groups	9.26	41.07	26.22	49.98
Among populations within groups	2.99	4.58	19.70	4.42
Within populations	87.75	54.35	54.08	45.60
Variance components				
Va	0.04521	0.14955	0.09595	0.21692
Vb	0.01458	0.01668	0.07208	0.01917
Vc	0.42848	0.19792	0.19792	0.19792
Fixation Indices				
FCT	0.09259	0.41069	0.26219	0.49980
FCS	0.03292	0.07773	0.26696	0.08832
FST	0.12246	0.45649	0.45916	0.54398
P-value				
Va and FCT	0.02444±0.00454	0.00000±0.00000	0.01564±0.00340	0.00000±0.00000
Vb and FCS	0.00880±0.00288	0.00000±0.00000	0.00000±0.00000	0.00000±0.00000
Vc and FST	0.00000±0.00000	0.00000±0.00000	0.00000±0.00000	0.00000±0.00000

Table 3: Spatial analysis of molecular variance (SAMOVA)

(Gu1,Gu2,Gu3,Gu4,Gu5,Gu6,Gu7,Gu8) : Guatemala 1,2,3,4,5,6,7,8, (CRT): Costa Rica Total, (VeT): Venezuela Total, (CoT) Colombia Total, (EcT): Ecuador Total, (CIT): Canary Islands Total.

*0.05, ***0.001

K	Group Composition	Φ_{CT}
2	(Gu1,Gu2,Gu4,Gu5,Gu6,Gu7,Gu8,CRT,VeT,CoT,CIT) (Gu3)	0.53611*
3	(Gu2,Gu3,Gu4,Gu5,Gu6,Gu7,Gu8) (Gu1) (CRT,VeT,CoT,CIT)	0.45870***
4	(Gu2,Gu4,Gu5,Gu6,Gu7,Gu8) (Gu1) (Gu3) (CRT,VeT,CoT,CIT)	0.48675***
5	(Gu4,Gu5,Gu6,Gu7,Gu8) (Gu1) (Gu2) (Gu3) (CRT,VeT,CoT,CIT)	0.49002***
6	(Gu2,Gu4,Gu5,Gu6,Gu7,Gu8) (Gu1) (Gu3) (CRT,VeT,CoT,CIT)	0.45356***
6	(VeT1) (VeT2)	

Table 4: Pairwise Φ_{ST}^{Values} between populations of *T. solanivora* in its native area and the remaining countries

(Gu1,Gu2,Gu3,Gu4,Gu5,Gu6,Gu7,Gu8): Guatemala 1,2,3,4,5,6,7,8, (CRT): Costa Rica Total, (VeT): Venezuela Total, (CoT) Colombia Total, (EcT): Ecuador Total, (CIT): Canary Islands Total.

*0.05, **0.01***0.001; NS: not significant.

	Gu1	Gu2	Gu3	Gu4	Gu5	Gu6	Gu7	Gu8	CRT	VeT
Gu1										
Gu2	0,06 ^{NS}									
Gu3	0,18***	0,08*								
Gu4	0,22***	0,13**	0,03 ^{NS}							
Gu5	0,16***	0,07**	0,05*	-						
				0,003 ^{NS}						
Gu6	0,15***	0,03 ^{NS}	0 ^{NS}	0,06 ^{NS}	-0,01 ^{NS}					
Gu7	0,17***	0,08*	0,08*	0,01 ^{NS}	-0,01 ^{NS}	0,001 ^{NS}				
Gu8	0,22***	0,14***	0,13**	0,04 ^{NS}	0,01 ^{NS}	0,05 ^{NS}	-0,02 ^{NS}			
CRT	0,48***	0,45***	0,47***	0,49***	0,38***	0,45***	0,46***	0,48***		
VeT	0,6***	0,65***	0,67***	0,7***	0,46***	0,65***	0,63***	0,63***	0,03**	
EcT,CoT, CIT	0,83***	0,92***	0,93***	0,95***	0,66***	0,92***	0,89***	0,87***	0,13***	0,08***

Table 5: Neutrality test for populations from Guatemala and remaining countries.

(Gu1,Gu2,Gu3,Gu4,Gu5,Gu6,Gu7,Gu8) : Guatemala 1,2,3,4,5,6,7,8, (CRT): Costa Rica Total, (VeT): Venezuela Total, (CoT) Colombia Total, (EcT): Ecuador Total, (CIT): Canary Islands Total.

*0.05

Sample site	Tajima's D	Fu's Fs	R2
Gu1	-0,71516	0,762	0,0992
Gu2	0,20057	-0,974	0,1533
Gu3	-0,10381	1,742	0,1507
Gu4	0,43511	-1,807	0,1145
Gu5	1,39383	4,693	0,2311
Gu6	0,93441	2,863	0,1603
Gu7	0,75367	0,23	0,1657
Gu8	1,08144	-0,409	0,1944
CRT,VeT,CoT,EcT,CIT	-1.82332*	-3.969*	0.025

Chapitre II:

Mise au point de marqueurs microsatellites chez *Tecia solanivora* :

Problèmes liés au développement de locus microsatellites chez les lépidoptères

L'isolement et la caractérisation de locus microsatellites semble plus difficile chez les Lépidoptères que dans d'autres taxons (Megléc & Solignac 1998; Ji *et al.* 2003). Dans une recherche bibliographique portant sur la période 2002 à 2009 dans *Molecular Ecology Notes* (renommé depuis *Molecular Ecology Ressources*) nous avons trouvé un total de 36 études portant sur le développement de marqueurs microsatellites chez les lépidoptères. Trente trois d'entre elles ont signalé l'existence de problèmes liée à l'isolement de ces marqueurs. Parmi ces problèmes, on peut citer la redondance des zones flanquantes, la forte proportion de marqueurs montrant un écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg ainsi que la faible densité de locus microsatellites.

En effet, chez les Lépidoptères, il est fréquent que les régions qui encadrent les locus microsatellites soient très semblables, voire identiques. Megléc *et al.* (2004) ont démontré la présence de plusieurs groupes de séquences très voisines dispersées dans le génome. Les séquences appartenant à un même groupe (ou famille) ont un taux de similitude de 95% et la

plupart ont une longueur de plus de 100 pb. Les similitudes peuvent concerner les régions amont et/ou aval des locus microsatellites. Les auteurs estiment que l'existence de plusieurs événements de duplication, touchant à la fois le locus microsatellite et ses régions flanquantes, serait à l'origine de la similitude entre séquences. L'occurrence de ces familles de séquences pose des problèmes dans l'amplification sélective d'un locus. Les amorces définies à partir d'une séquence clonée peuvent, en raison de la répétition des régions flanquantes dans le génome, amplifier simultanément plusieurs locus. Ainsi, à partir d'une même paire d'amorces, on obtient l'amplification de fragments qui ne sont pas nécessairement alléliques et dont le nombre peut excéder deux.

Un autre problème, récurrent chez le lépidoptères, est l'existence d'un déficit en hétérozygotes important pour la plupart des locus isolés (Meglecz *et al.* 2004), ce qui occasionne un écart à l'équilibre d'Hardy-Weinberg. Le déficit en hétérozygotes est vraisemblablement dû à la présence d'allèles nuls. En effet, le taux élevé de mutation dans les zones flanquantes peut empêcher le bon accrochage d'une amorce et nuire à l'amplification d'un des allèles.

Enfin, un autre problème, souvent évoqué dans la littérature, concerne la faible abondance des marqueurs microsatellites dans le génome. Même si la quantité de séquences microsatellites varie énormément entre taxons, le génome des lépidoptères semble généralement posséder une faible fréquence de ces séquences (Zhang 2004; Meglécz *et al.* 2007; Ji *et al.* 2003). Par exemple, (Nève & Meglécz 2000) ont signalé la publication de seulement cinq études sur les lépidoptères entre 1997 et 1999 alors que 47 étaient publiées chez les hyménoptères pendant la même période. Zhang (2004) signale également que sur 20 études chez les lépidoptères, le nombre de locus n'est jamais supérieur à 5 par banque génomique développée.

1. Dynamique évolutive de microsatellites chez les Lépidoptères

Puisque les microsatellites de plusieurs organismes ont été associés à des éléments mobiles (rétroéléments et rétroséquences) Zhang (2004), ont proposé un modèle expliquant les deux caractéristiques principales des microsatellites chez le lépidoptères, à savoir la redondance de leurs régions flanquantes et leur faible fréquence.

Zhang (2004) font l'hypothèse que dans un premier temps, un microsatellite est créé. Ce microsatellite peut faire partie d'un élément mobile. Dans ce cas, il va se *propager* et ses copies se *dispenser*. Au cours de cette phase, le microsatellite va se multiplier et se répandre dans le génome via la transposition des éléments mobiles. Cette transposition peut être à l'origine de la présence de nombreux fragments identiques d'ADN associés aux microsatellites tout au long du génome (régions flanquantes identiques). Les auteurs proposent ensuite une dernière étape de *diversification*. Pendant cette phase, les séquences vont diverger les unes des autres indépendamment les unes des autres par accumulation de mutations. Si le temps de divergence est suffisant, les régions flanquantes identiques vont devenir des séquences uniques encadrant un microsatellite.

Si les microsatellites sont associés aux séquences mobiles et si elles suivent les trois étapes successives décrites plus haut, nous pouvons supposer que les microsatellites de lépidoptères sont dans un état primaire d'évolution. C'est-à-dire que les séquences ont subi une propagation récente dans le génome. Ainsi les régions flanquantes n'ont pas accumulé beaucoup de mutations et reste relativement similaires.

2. Développement de marqueurs microsatellites chez *T. solanivora*

L'obtention de locus microsatellites chez *T. solanivora* a nécessité un an et demi de travail. En effet, nous avons été confrontés aux problèmes typiques de l'isolement de marqueurs microsatellites chez les lépidoptères décrits dans la littérature et résumés ci-dessus. Il faut noter que la banque génomique de *T. solanivora* a été développée conjointement avec celle d'une autre espèce de Gelechiidae *Phthorimaea operculella*, pour laquelle nous n'avons eu aucun succès.

Nous avons développé deux banques différentes en utilisant 2 enzymes de restriction *RsaI* et *DraI*. Nous avons hybridé un nombre très important de clones (4 800) dont seulement un tiers s'est révélé positif. Sept cent quatre-vingt seize clones ont été séquencés parmi lesquels seuls 8,7% se sont avérés non redondants. Nous avons également rencontré des difficultés dans l'étape de séquençage. Ces difficultés ont été levées en utilisant différents protocoles de purification. Soixante-dix séquences ont été retenues pour la définition d'amorces. Entre deux et quatre paires d'amorces ont été dessinées pour chacune des 70 séquences. Toutes les combinaisons d'amorces (*forward* et *reverse*) ont été testées. Malgré l'utilisation de plusieurs couples d'amorces, un grand nombre de marqueurs ont présenté des allèles nuls. Nous sommes finalement parvenus à isoler et caractériser 9 locus microsatellites qui sont tous à l'équilibre Hardy-Weinberg.

La lecture des génotypes de ces neuf locus microsatellites nécessite aussi une attention spéciale. En effet, les locus isolés présentent des allèles différant par insertion/délétion d'une seule base (*Single nucleotide indel mutation*) ce qui rend difficile l'identification précise de la taille de l'allèle sur le séquenceur automatique. Pour éviter des erreurs de lecture, des témoins positifs ont été ajoutés à chaque amplification. Cela nous a permis de calibrer la lecture de

chaque allèle pour chaque locus. En outre, l'identification des quelques individus hétérozygotes n'a été possible qu'après amplification en conditions radioactives et migration sur gel de polyacrylamide.

Les neuf locus isolés seront utilisés pour fournir une meilleure compréhension de changements génétiques de l'espèce survenus au cours du processus invasif.

Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in the Potato Tuber Moth *Tecia* *solanivora* (Povolny, 1973) (Lepidoptera: Gelechiidae)

Acceptés dans *Molecular Ecology Ressources* (2009), 9, 1167-1169.

Torres-Leguizamon M¹, Solignac M², Vautrin D², Capdevielle-Dulac C¹, Dupas S^{1,3},
Silvain J-F¹

¹Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UR072 Laboratoire Evolution,
Génomes et Spéciation, UPR 9034, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS),
91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France et Université Paris-Sud 11, 91405, Orsay Cedex, France.

² Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation, UPR 9034, CNRS, 91198 Gif-sur-Yvette
Cedex, France et Université Paris-Sud 11, 91405, Orsay Cedex, France.

³ Pontificia Universidad Catolica del Ecuador, Facultad de Ciencias Naturales y Biologicas,
Whymper 442 y Coruña, Quito, Ecuador.

Keywords : Lepidoptera, Gelechiidae, microsatellites, invasive species, population genetics.

Corresponding author:

Magally Torres Leguizamon : Phone: +33 169 823 712, Fax: +33 169 823 736

E-mail: Magally.Torres@legs.cnrs-gif.fr

Main Text

T. solanivora is an invasive species that attacks potato *S. tuberosum* L. both in fields and in storerooms. The emerging larvae feed inside the potato tubers where they build galleries which result in partial to complete tuber destruction. The species is likely indigenous to Guatemala, and was accidentally introduced and became invasive in Costa Rica, Venezuela, Colombia, Ecuador and finally the Canary Islands. Owing to its invasive status, and the damages it causes to the potato crops, *T. solanivora* is currently considered as one of the most serious pests of potato tuber in Central and South America.

Genetics studies are currently underway to better understand the invasion pathways of *T. solanivora* with the aim of developing sustainable management approaches (Puillandre *et al.* 2008). Previous studies using mitochondrial sequences revealed a strong decrease in haplotype diversity in the invaded area and the presence of a single haplotype in Colombia and Ecuador (Puillandre *et al.* 2008).

We developed microsatellite markers in order to analyze the changes occurring at the nuclear genome level and to be able to estimate demogenetic parameters throughout the invasion process. Here we report the isolation and characterization of nine polymorphic loci in the Potato tuber moth *T. solanivora*.

Genomic DNA was obtained from a single *T. solanivora* thorax from Guatemala using the DNeasy Tissue Kit (Qiagen). In order to maximize the success of microsatellite isolation two microsatellite-enriched libraries were prepared following the Duthech *et al.* (2000) protocol with modifications by Giraud *et al.* (2002). DNA (50ng) was digested with two restriction enzymes: (Library 1 : DraI ; Library 2 : RsaI). The DNA fragments were ligated

using the adaptators MLU1A 5' CTCTTGCTTACGCGTGGACTA 3' and MLU1B 5' TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA 3' and were then amplified by polymerase chain reaction (PCR). The amplification products were hybridized to biotin- labelled microsatellite oligonucleotides (TC)₁₀ and (TG)₁₀ and captured by streptavidin Magnesphere paramagnetic particles (Promega). The captured fragments were ligated using pGEM- T Easy Vector System II (Promega) and transferred into electrocompetent cells Top 10F', (Invitrogen). The recombinant clones were transferred onto nylon membranes (Hybond-N+, Amersham) and screened by hybridization using the same stocks of dinucleotide digoxigenin-end-labelled oligonucleotide probes (Roche Diagnostics GmbH). Plasmid DNA from positive clones was purified using Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System Kit (Promega) and the inserts were sequenced with the ABI Prism 3130 automatic sequencer using the Big-Dye Terminator Sequencing Kit (Both from Applied Biosystem).

For the first library, 1200 clones were hybridized, only 96 were positive and all of these were sequenced. For the second library approximately 3600 clones were transferred to the membranes and 1500 were positive, 700 clones were sequenced. For both libraries only the useful sequences (good quality, good microsatellite repeat size, with enough length to design primers) were aligned using CLUSTAL W multiple sequence alignment (Thompson J.D. *et al.* 1994) in order to detect the sequences that shared similarities between flanking regions. Most of the sequences were removed because they had almost identical flanking regions. Primer design was achieved using OLIGO version 6 (Rychlik 2000) and PRIMER3 (Rozen & Skaletsky 1998) software on 70 suitable sequences. Between two and three primers pairs were designed for each locus to solve the frequently observed problem of nulls alleles presence (Meglécz *et al.* 2007).

Initially the different combinations of primers designed for the 70 loci were tested in 8

individuals from different countries (3 individuals from Guatemala, 2 from Costa Rica, 2 from Venezuela and 1 from Ecuador). Both the polymorphic loci and the loci that did not show null alleles were then tested in two different populations (28 individuals from Guatemala and 30 individuals from Costa Rica). All the primer combinations designed for the 70 loci were tested by radioactive polymerase chain reaction (PCR). Reactions were performed using a Biometra T1 Thermal cycler with 35 cycles of 94°C 2mn, 94°C 20s, 55°C 10s, and 70°C 30s. Each amplification (10ml) contained 5-10ng of genomic DNA, 1ml 10X Taq Buffer with 25mM Mg²⁺5 prime (QIAGEN), 75mM of dCTP, dGTP, dTTP and 6mM of dATP, 0.2g/L BSA, 2.5pmol of each primer, 0.25 U of Taq DNA polymerase 5 prime (QIAGEN) and 0.01 N Ci (3.7 10³ Bq) of [³²P]-dATP. PCR products were separated in 6% denaturing polyacrylamide gels and the results were visualised by autoradiography.

Genomic DNA from 58 individuals belonging to 2 different populations (28 individuals from Guatemala and 30 individuals from Costa Rica), was used to test polymorphism in natural populations. Out of 70 loci tested, sixteen were highly polymorphic. Of these, seven showed a significant departure from Hardy-Weinberg equilibrium due to a deficit of heterozygotes (data not shown).

Only nine microsatellite loci were in Hardy-Weinberg equilibrium. These loci did not show presence of null alleles, when tested using Microchecker software (Van Oosterhout *et al.* 2004). The number of alleles per locus (ranging from 5 to 22), observed and expected heterozygosity, Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium were analysed using GENEPOP on the web (an update of Raymond & Rousset 1995) and are shown in Table 1. All loci were in linkage equilibrium.

The nine *T. solanivora* microsatellite loci were tested in three other Gelechiidae species (*Symmetrischema tangolias*, *Phthorimaea operculella*, *Tuta absoluta*) which occur in Andean countries on potato or tomato. Eight individuals for each species were tested. Only the locus 16H7 amplified for the three species.

Microsatellite loci are among the most commonly used markers in population genetics and phylogeography. However there have been difficulties in developing microsatellite loci within the Lepidoptera. Some of the difficulties have been attributed to: (1) existence of multiple copies of microsatellite sequences in the genome (Nève & Megléc, 2000); (2) similarity of the flanking regions, which in some cases are almost identical (Megléc *et al.* 2004); (3) low frequency of microsatellite loci in Lepidoptera genomes (Ji *et al.* 2003; Zhang 2004); and (4) a very high frequency of null alleles (Megléc *et al.* 2007), probably the cause of loci departure from Hardy-Weinberg equilibrium. Using the “web of science” search engine, we looked for Lepidoptera articles published in Molecular Ecology Notes between 2002 and 2008. We found 33 published papers, 30 mentioned the complications discussed above regarding the isolation of microsatellite loci in Lepidoptera. We encountered the same difficulties nevertheless the technical approach we used permitted us to develop nine highly polymorphic microsatellites with no null alleles. These markers are expected to be useful tools for *T. solanivora* populations genetic. They will initially be used to delimit the area of origin of the species, and to compare nuclear and mitochondrial changes in *T. solanivora* genetic diversity during the invasion process. In particular, they will especially be used to detect bottleneck events and to estimate their severity.

Acknowledgements

The authors wish to thank Sabrina Baudry, Amandine Fossoud and Isabelle Merlin for technical assistance, Florence Mougél, Lisa Pope (Molecular Ecology Notes Subject Editor), and Michele Schiffer for their helpful comments and suggestions for improving the manuscript, and Yannery Gomez and Jean-Louis Zeddám for providing samples from Costa Rica and Guatemala.

Table legend

Table 1 : Characteristics of nine microsatellite loci isolated in *T. solanivora*. ASR: allele size range, N all: total allele number, N: allele number in each population, N: allele number in each population, Ho: observed heterozygosity, He: expected heterozygosity, HWE test: p-values for the Hardy-Weinberg exact test.

Locus ID	Primer	Ta	Total			Guatemala		Costa Rica		
Motif			ASR	N	N	Ho	HWE	Ho	HWE	
GenBank				all			test			
accession no.	Sequence (5'-3')	(°C)	(bp)							
1A3 (AC)11 FJ560959	F: 6Fam-TGATCTGACATGGCTTGG R: ATGGGTCGTGGGTCGT	55	87-114	13	12	24 24.8	0.51	11	20 23.8	0.21
5D11 (AC)12 FJ560960	F: Pet-GTCAGAGGTGGCGATT R: AGGTTAGTTTAGGACTTCA	55	158-194	18	17	25 24.9	0.6	11	24 24.4	0.56
11A8 (GT)4...(TG)4 FJ560961	F: 6Fam-ATCGTTCGGCATTCTCA R: CGACCTAAATCAAAG	55	182-229	22	20	15 15.9	0.1	12	14 13.7	0.6
15B5 (GT)12 FJ560962	F: Vic-ATTCCGGTTGGGTAGTAGAA R: TTATCAGCATCAAATGTCGT	50	205-254	21	20	21 21.6	0.08	7	22 23.1	0.15
15F1 (GT)3G(GT)4 FJ560963	F: Pet-AGAAAAACAAAATACAAGCAAA R: ACTGGAGACCTACTTAAATAAATG	50	175-194	8	7	19 18.6	0.58	5	14 14.3	0.27
15H1 (CA)11 FJ560964	F: Ned-ACCTACTAAAACTGGCTGAA R: GATCAAGATATGTCCTTTTCGTAT	50	199-216	9	8	21 22.2	0.7	6	16 20.1	0.11
16H3 (TG)9 FJ560965	F: Ned-ACCTCACTGTCATACGGA R: TCTTCTTGGCGTTGAAATAG	50	226-239	11	11	24 24.1	0.5	7	21 21.3	0.79
16H5 (TG)10 FJ560966	F: 6FamCAAACACATAACAATTCAAACG R: GTCACAGAATACTACGGCTTT	50	249-285	14	13	22 23.7	0.89	7	23 21.3	0.21
16H7 (CT)4(CA)9 FJ560967	F: Vic-GCAGCGAAATAAACA R: CAGGGTCATCCCAAA	50	180-204	9	8	21 22.3	0.1	6	15 15.8	0.23

Chapitre III:

Utilisation des marqueurs microsatellites pour retracer les routes d'invasion de *Tecia Solanivora*

Une approche génétique des processus d'invasions est intéressante pour plusieurs points. Tout d'abord, cela permet d'améliorer notre compréhension des mécanismes d'invasions, mais également cela permet une observation en "temps réel" de processus écologiques et évolutives difficilement accessible dans un autre contexte (Sax *et al.* 2007). De plus, mieux comprendre les routes d'invasions est essentiel pour lutter contre les espèces invasives. Dans certaines situations, l'étude de la diversité génétique au sein des différentes populations de l'espèce invasive permet de donner des indications chronologiques sur les processus d'invasions (Rollins *et al.* 2009). En effet, les processus d'expansion induisent des « bottleneck » génétiques à chaque événement invasives. La diversité génétique des populations introduites, composées par des sous-échantillons de la population source, diminuerait au cours du processus d'invasion. D'autre part, l'étude de la diversité génétique des populations introduites est considérée comme primordiale car c'est la diversité génétique qui va en partie contrôler la capacité des populations introduites à survivre et s'adapter à leur nouvel environnement. Les routes d'invasion ainsi que la caractérisation de la variabilité génétique des espèces envahissantes peuvent être analysés par des approches de génétique de

population classique mais aussi par des approches Bayessiennes (ABC) (Estoup *et al.* 2004; Pascual *et al.* 2007).

Tecia solanivora (Povolny 1973) est une espèce invasive qui s'attaque aux tubercules de *Solanum tuberosum* L. La larve se nourrit des tubercules donnant lieu à une destruction partielle ou totale du tubercule. La présence de la teigne a été reporté pour la première fois en 1956 au Guatemala puis elle a envahit l'Amérique Centrale puis du Sud pour enfin arriver jusqu'aux Iles Canaries. Les détails des reports de la présence de l'espèce sont donnés dans les chapitres précédents.

Les objectifs de l'étude étaient de (i) décrire l'histoire de la colonisation de *Tecia solanivora* à l'aide d'une approche de génétique classique et des méthodes bayésiennes et (ii) d'aborder la question de la variation génétique dans les populations de l'espèce lors du processus d'invasion.

150 individus (i.e. 30 par pays) ont été collecté grâce à des pièges à phéromone. Le protocole est décrit dans les chapitres précédents. Nous avons extrait l'ADN du thorax des individus et génotypés les échantillons en utilisant neufs loci microsatellites de Torres-Leguizamon *et al.* (2008). Les variations de taille des fragments microsatellites ont été visualisées avec « ABI Prism 3100 automatic sequencer » et mesurées avec GENOTYPER software.

L'écart à l'équilibre d'Hardy-Weinberg des données microsatellites a été testé en utilisant GENEPOP version 4.0 et la présence d'allèles nuls a été testée en utilisant MICRO-CHECKER. Le nombre moyen d'allèles par locus (N_a) et le nombre d'allèles avec une fréquence supérieure ou égale à 5% ont été calculés avec GENEALLEX (Peakall & Smouse, 2006). Une ANOVA et un test post-hoc de Tukey HSD ont été utilisés pour détecter des différences significatives entre les différents pays grâce au logiciel R 2.7.1 (R Development

Core Team 2008). Pour tester la présence de « bottleneck » génétiques, nous avons utilisé BOTTLENECK version 1.2.02 (Piry *et al.* 1999). Pour estimer le nombre de groupes génétiques nous avons utilisé STRUCTURE 2.2 (Pritchard *et al.* 2000). Pour représenter les relations entre les populations analysées nous avons créé des arbres du type « neighbor joining » avec le programme POPULATIONS en utilisant les chord distances de Cavalli-Sforza & Edwards (1967). Les valeurs de F_{ST} et leur signification ont été calculées en utilisant GENEPOP web version 4.0.

Pour tester les différentes routes d'invasions de *Tecia solanivora* nous avons utilisé le programme DIY ABC (Cornuet *et al.* 2008). Le programme suit les étapes détaillées dans la figure 1. Nous avons testé 21 scénarii d'introduction qui diffèrent par la source d'introduction et la présence de bottlenecks. Les scénarii sont détaillés dans la suite du chapitre.

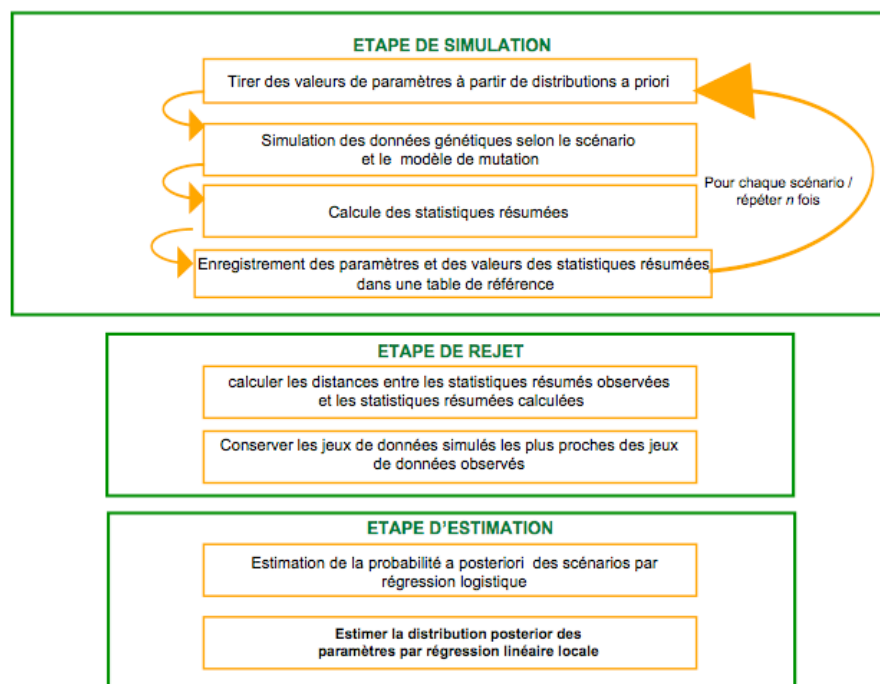


Figure 1: Description des étapes de fonctionnements de DIY ABC

Les neuf locus utilisés ne montrent pas d'écart à l'équilibre d'Hardy-Weinberg. L'ANOVA indique des différences significatives pour le nombre moyen d'allèle par locus entre les pays et le test post hoc de Tukey HSD indique que le Guatemala a le nombre d'allèles par locus le plus important suivi d'un groupe formé par le Costa Rica et le Venezuela puis l'Equateur et les Iles Canaries forment le dernier groupe avec le nombre moyen d'allèles par locus le plus faible. L'hétérozygotie attendue suit le même type de pattern.

Le test de Wilcoxon ne détecte qu'un seul « bottleneck ». Il concerne la population échantillonnée dans les Iles Canaries. Les valeurs de F_{ST} sont élevées entre toutes les populations. Le programme STRUCTURE montre la présence de 5 clusters génétiques. Les valeurs de F_{ST} et les groupes formées par STRUCTURE montrent que la population du Guatemala est plus proche de celle du Costa Rica que du reste des pays. Les populations du Costa Rica et du Venezuela sont génétiquement proches, alors que les populations d'Equateur et des Iles Canaries sont largement différentes des autres. L'arbre formé par méthode NJ montre deux groupes différents dans les populations introduites. Le premier est formé par les populations du Costa Rica et du Venezuela et le second par les populations d'Equateur et des Iles Canaries. La comparaison de scénarii de routes d'invasion à l'aide du logiciel DIY ABC a valide un scénario qui comprend un premier bottleneck au Guatemala (l'aire d'origine de l'espèce) dû au passage de l'espèce de la plante sauvage à la plante cultivée. Ensuite, il y aurait eu une introduction des individus provenant de Guatemala vers le Costa Rica. L'invasion de l'Amérique du Sud serait due à trois introductions indépendantes provenant du Costa Rica, la première vers le Venezuela, la deuxième vers l'Equateur et la dernière vers les Iles Canaries. A chaque étape de l'introduction il y aurait eu un bottleneck génétique qui serait beaucoup plus fort dans les dernières populations établies.

Les informations sur les populations sources des espèces introduites tout comme la description des routes d'invasion sont cruciales pour comprendre et gérer les invasions biologiques. Cette information peut être obtenue à partir de données directes et indirectes (comme le contrôle dans les aéroports, les données d'historique, les hypothèses de dispersion, etc). (Suarez *et al.* 2001) Néanmoins, la plupart du temps il y a un manque de précision de ces informations. Dans notre cas, l'analyse génétique des populations de *Tecia solanivora* contredit le scénario hypothético-historique. Les méthodes traditionnelles d'analyses génétiques et les analyses ABC ont été très utiles pour discriminer entre différents scénarios complexes d'invasion. En autres, l'analyse ABC a donné un éclairage sur des paramètres démographiques cruciale qui peuvent influencer sur le succès invasive. Une fois de plus l'analyse génétique de population apparait comme un outil performant pour caractériser les processus d'invasion.

Reconstitution of *Tecia solanivora* invasion history: genetic inference confronted to historical data.

En préparation

M. Torres-Leguizamón^{1*}, S. Dupas^{1,2}, J-F Silvain¹

¹ IRD, Institut de Recherche pour le Développement, UR 072, Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation, UPR 9034, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), 91198 Gif sur Yvette Cedex, France et Université Paris-Sud 11, 91405 Orsay Cedex, France.

² IRD, Institut de Recherche pour le Développement, UR 072, Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), Laboratorio de Bioquímica y Microbiología molecular, Quito, Ecuador.

* Corresponding author: magally.torres@legs.cnrs-gif.fr, telephone number +33 0169824251, Fax +33 0169823736

Introduction

Genetic information regarding the source, pathways of a colonization process and some parameters such as the number of founders or hybridization process between populations can improve our understanding of the invasions phenomena. Those parameters are considered to be crucial for the success or failure of biological invasions (Sakai *et al.* 2001; Gaskin & Schaal 2002; Wares *et al.* 2005; Dlugosch & Parker 2008; Puillandre *et al.* 2008; Ciosi *et al.* 2008; Rollins *et al.* 2009). The population events during colonization process and their correlative genetic changes (bottleneck and hybridization) may correlate to adaptive potential of species in new environments. Invasion process constitutes real time experiment of interaction between a new gene pool and a new environment that may provide general insights on the ecology and evolution of species (Sakai *et al.* 2001; Lee 2002, Petit *et al.* 2004, Sax *et al.* 2007). In the context of invasive species control, the information about colonization pathways is essential to develop management strategies to prevent further introductions, or to establish better control strategies. The informations are also useful to predict future spread of invasive species. In some situations the analyses of genetic diversity change across an introduced species' range can indicate the chronological order of colonization (Rollins *et al.* 2009) and allow quantifying the effect of introduction events on genetic variation. Range colonization could result in a series of genetic bottlenecks occurring successively when individuals are introduced into a new area (before populations increase in number). In such scenario, the genetic diversity of introduced populations could decrease successively along the invasion process, and populations resulting from successive bottlenecks are expected to increase their divergence (Le Corre & Kremer 1998; Pruett & Winker 2005). In this case, each of these successive populations is composed of a smaller sub-sample of genotypes originating from only one source population that may also have

experimented a genetic reduction in itself. The effect of sequential founder events had been examined before in natural populations (Onyabe & Conn 2001, Gautschi *et al.* 2002) and in laboratory experiments (Meffert & Bryant 1992). The pathways of the colonization process as well as the characterization of the genetic structure and variability of invasive species can be analyzed by traditional population genetic approaches and also by Approximate Bayesian Computation (ABC) Framework (Pascual *et al.* 2007). The ABC methods are interesting because they have the potential to handle virtually any complex models provided that simulations of data under the model is feasible; another potentially attractive feature of Bayesian analysis is the ability to incorporate background informations into the model specification (Beaumont *et al.* 2002, Beaumont & Rannala 2004). In the context of characterizing introduction history of invasive species ABC methods have shown their utility to discriminate between complex invasion scenarios and to estimate useful quantitative insights into demographic parameters of interest (Estoup *et al.* 2004; Pascual *et al.* 2007).

Tecia solanivora (Povolny, 1973) is an invasive species that attacks the tubers of the potato *Solanum tuberosum* L. The emerging larvae feed inside the potato tubers where they build galleries leading from partial to complete tuber destruction, the number of generations par year is strongly correlated with temperature and humidity, in laboratory it is estimated to 2 to 10, for a temperature range that varies between 10°C and 20°C. The optimum of development occurred at 15 ° C (Torres 1989; Notz 1996; Álvarez & Trillos, 1999, Dangles *et al.* 2008). Little information is available about developing time in field, nevertheless some larval states seems to be longer (Barreto *et al.* 2003) The pest was reported for the first time in Guatemala in 1956. In 1970 it was reported in Costa Rica where most of the potato crops were destroyed by the species (Murillo 1980). In 1973 it was recorded in Panama. In the same year, it was described for the first time from moths and larvae collected in Costa Rica

(Povolny 1973) and named *Scrobipalopsis solanivora*. At this time there were no record of the pest in other central American countries growing potatoes at the north of Guatemala; as Mexico, between Guatemala and Costa-Rica; as Salvador or Nicaragua, or in the caribbean islands; as the Dominican Republic (Murillo 1982). *T. solanivora* has also been reported in Nicaragua in 1989 and in Honduras in 1982 (Murillo, 1982). The pest arrived in South America, in Venezuela at the end of 1983 thought an importation of infected seeds from Costa Rica (Salazar & Escalante 1984; Torres 2003; Niño 2004); in 1985 the species reached the border area between Venezuela and Colombia and began to colonize the central and southern zone of that country (Rincon & Lopez-Avila 2004). In 1996 *T. Solanivora* was reported in Ecuador (Gallegos *et al.* 1997). Finally in 1999 the presence of the species was recorded in the Canary Islands (Niño 2004) where an illegal importation of one bag of infested potatoes from South America has been reported (EPPO 2006). No accurate information is available about the geographic origin of the Canary Islands' populations; nevertheless it is thought that the species was introduced illegally with potatoes from Colombia, Ecuador or most likely Venezuela. *T. solanivora* is now reported as a serious pest on potato crops and stocks in countries where it is present (EPPO 2006) (fig1).

Hypothetical scenario of introduction

T. solanivora may be native from Central America Guatemala, first the pest invaded Costa Rica and after may have invaded Venezuela because of importation of contaminated seeds coming from Costa Rica. Then, the species invaded South America step by step spreading between neighbour countries, from Venezuela to Colombia and from Colombia to Ecuador. Finally populations of Canary Islands may come from illegal seeds importation most likely from Venezuela.

The aims of this study are: (i) to describe the colonization history of *Tecia solanivora* (ii) to address the question of the variation of the genetic variability in populations of the species across the invasion process.

Materials and methods

Collection of samples and study sites

We used pheromone traps to capture adults of *Tecia solanivora*. One site was sampled in almost all the countries where *T. solanivora* was observed. (Guatemala, Costa Rica, Venezuela, Ecuador and the Canary Islands). The sampling locality was chosen as close as possible to the site of introduction of the species as reported in the literature. A total of 150 individuals, 30 by country, were collected and genotyped. Samples were preserved in 95% ethanol prior to molecular analysis.

DNA extraction and amplification

Genomic DNA samples were extracted using the DNeasy Tissue Kit (Qiagen). We used the thorax from *T. solanivora* individuals from all the countries sampled. The remaining body parts were stored in 95% ethanol. We genotyped the samples using nine microsatellite loci (1A3, 5D11, 11A8, 15B5, 15F1, 15H1, 16H3, 16H5, 16H7) from Torres-Leguizamon *et al.* (2008) PCR reactions were performed using a Biometra T1 Thermal cycler with an initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of the three following steps: denaturation at 94°C for 1min, annealing at 59°C for 1 min 30 s and extension at 72°C for 1 min 30 s. The final extension was done at 72°C for 5 min. Each amplification (25µl)

contained 1 µl of DNA, 5µl of reaction buffer 5X, 3µl of MgCl₂ 25 mM, 0.6µl dNTP 10 mM, 1µl of each primer at 10 mM and 1 unit of Taq polymerase (Promega). Microsatellite DNA fragment length variation was visualized by capillary electrophoresis with the ABI Prism 3100 automatic sequencer. Allele length variation was scored with GENOTYPER software (both from Applied Biosystems).

Statistical analyses

Microsatellite data were tested for departures from Hardy-Weinberg and Linkage equilibrium using GENEPOP on the web version 4.0 (an update of Raymond & Rousset 1995), and the presence of null alleles was tested using MICRO-CHECKER software (Van Oosterhout *et al.* 2004).

In order to analyze genetic variation within populations we examined the allelic patterns between them: the mean number of alleles per locus (N_a), the number of alleles with frequency superior or equal of 5%; the number of less common alleles and the expected heterozygosity (H_e), were calculated using the software GENEALEX (Peakall & Smouse 2006). ANOVA (analysis of variance) and Post-hoc TukeyHSD tests were performed on the mean number of alleles per locus in order to test for population level effect and for the difference between population pairs. To avoid heteroscedasticity (different variances), number of alleles per loci were rank-transformed before analyses. Analyses were done using R 2.7.1 (R Development Core Team 2008).

To test for the presence of recent genetic bottlenecks in each population we used the heterozygosity excess method (Cornuet & Luikart 1996) implemented in the software BOTTLENECK version 1.2.02 (Piry *et al.* 1999). We tested the two-phase model (TPM) with

50% or 75% of loci following the model (SMM) single stepwise mutation because of the presence of even and uneven allele size in loci. The remaining loci follow multiple step mutations model. Heterozygote excess was tested using the Wilcoxon signed-rank test because it is preferable when few loci are used (Cornuet *et al.* 1999)

We used the software STRUCTURE 2.2 (Pritchard *et al.* 2000) to estimate the number of genetic clusters (K) present among all populations. This software generates clusters of individuals based on Hardy-Weinberg model of genotypic distributions. Simulations were run using the admixture model without prior population information. We modelled cluster assignments for K= 2-7 clusters. We made 4 independent runs, for each K to confirm consistency across runs. In all simulations we performed a burn-in period of 50 000 iterations and 1 000 000 Markov chain Monte Carlo iterations. To choose the most likely value of K we used the ΔK method of Evanno *et al.* (2005).

In order to represent the relationships between the analysed populations, we used the software POPULATIONS (Langella 2002) to draw a neighbor joining tree (NJ). The tree was constructed using the chord distance of Cavalli-Sforza & Edwards (1967), with 1000 bootstrap replicates over loci. We used MEGA 4 software (Tamura *et al.* 2007) to visualize tree. We also calculated the F_{ST} values and their significance, using GENEPOP on the web version 4.0 (an update of Raymond & Rousset 1995).

We compared the different scenarios of invasion routes of *Tecia solanivora* using the software DIY ABC (Cornuet *et al.* 2008) this software performs ABC inference on population microsatellite genetic data. The analysis is done in three steps, the first step is the simulation:

(a) We draw parameters values from prior distribution. In our case the historico-demographic parameters of scenarios were: (i) the number of generations between each

demographic event and the sampling date (assuming three generations per year,) (Barreto *et al.* 2003; Kroschel 2008) ($t_1, t_2 \dots t_n$); (ii) the effective population size apart from putative bottleneck periods was assumed to be the same in all populations (NS, prior from 1000 to 10000). NS was chosen according to field data (Niño personal communication), (iii) the effective number of founders that was also the same between population (ranging from 5 to 500) and the duration of the bottleneck (NF). Because of the lack of information about the source of Canary Islands populations we made scenarios using admixture rates (ranging from 0,001 to 0,999).

- (b) We simulated genetic data according to the scenario and a mutation model, in our case we supposed different scenarios of invasion that are described below and we used the Generalized Stepwise Mutation model (GSM) with a single nucleotide indel mutation.
- (c) We computed summary statistics: we selected all summary statistics proposed by the software. (mean number of alleles and mean genetic diversity, F_{ST} , shared allele distance, among others).
- (d) finally we created a reference table containing parameters used and the summary statistics computed.

The second step of ABC analysis is the rejection step in this phase we computed distances between observed and simulated summary statistics and we retain simulated data sets closest to observed data.

The third and final step is the estimation: We estimated the posterior probability of scenarios by logistic regression and we estimated the posterior distribution of parameter by local linear regression.

We tested 21 introduction scenarios that differed in the source of introduction and the presence or not of bottlenecks (Table 2). The scenarios were nested, adding more recent

populations (according to date of signaling of *T. solanivora* in the country) step by step. Once the best ancient scenario was obtained, it was fixed and a more recent population was included. The more recent populations could not be the source of the older populations, whereas the source of the recent populations could be any of the older populations, depending on the scenario.

Results

Genetic variation along the invasion process

The nine microsatellite loci analyzed showed no departure from Hardy-Weinberg equilibrium within populations, there was non-evidence of linkage disequilibrium across loci, and we did not detect the presence of null alleles in any population tested (data not showed). The highest value of mean number of alleles per locus (N_a) was found in the population from the supposed origin area of the species (Guatemala) ($N_a=11.22$). The mean number of alleles decreases in the invaded area populations, according to the chronological order of appearance of the species aforementioned in the literature. Populations from Costa Rica ($N_a=7.4$) and Venezuela ($N_a=7$) had higher number of alleles than populations from the countries at the edge of the species range expansion: Ecuador ($N_a=3.4$) and Canary Islands ($N_a=3.7$). The expected heterozygosity (H_e) followed almost the same pattern Guatemala ($H_e=0.7$), Costa Rica ($H_e=0.6$), Venezuela ($H_e=0.6$), Ecuador ($H_e=0.5$) and Canary Islands ($H_e=0.5$). The number of alleles with a frequency superior of 5%, was high across all the populations. In addition all population shared the same common alleles. The less common alleles have been lost during the invasion process (fig 2).

ANOVA indicates a strong country effect ($p<0.0001$). Nevertheless statistical

comparison between pairs of populations (Tukey HSD test) showed that the mean of number of alleles between Costa Rica and Venezuela populations was not significantly different ($p=0.8$). However, these two countries significantly differed from the others. This is also the case between Ecuador and Canary Islands ($p=0.9$). The mean number of alleles per locus was always significantly different between Guatemala and the rest of the countries ($p<0.05$).

The Wilcoxon test detected a bottleneck in Canary Islands population only ($p<0.1$). This result did not change when we modified the percentage of loci follows the single stepwise mutation model SMM into the two-phase model (TPM) implemented.

Pairwise F_{ST} values and associated probabilities indicated significant genetic differentiation between all populations sampled ($p<0.1$). The lowest F_{ST} values were found between Guatemala and Costa Rica (0.07) and between Costa Rica and Venezuela populations (0.05). The two other lowest F_{ST} values were found between Costa Rica and Ecuador (0.09), and Costa Rica and Canary Islands populations (0.11) (Table 1). Five clusters were identified using STRUCTURE and Evanno *et al.* (2005) method (fig 3 and 4). The clusters found were consistent with the F_{ST} Values. STRUCTURE identified 5 clusters corresponding to 2 separate clusters in Guatemala coming from one sample site, one cluster grouping Costa-Rica and Venezuela, one cluster corresponding to Ecuador, and one cluster corresponding to Canary Islands. Populations from Costa Rica and Venezuela appear genetically close, and Ecuador and Canary Islands population are highly differentiated from the others. The NJ tree did not separate all the introduced populations. Population from Costa Rica and Venezuela are grouped together, and the populations from Ecuador and Canary Islands too (fig 5).

ABC computations comparison of scenarios introduction

The posterior probabilities rejected all scenarios assuming the absence of any bottleneck period (Table 2) (scenarios 2, 5, 9, 10, 11, 16, 17, 18), as well as all scenarios including admixture between populations (scenarios 19, 20, 21). For the first step, scenario 1 (introduction of individuals from Guatemala to Costa Rica, and from Costa Rica to Venezuela) was more strongly supported than the others and was fixed in the scenarios including more recent populations. Three bottlenecks were hypothesized: the first bottleneck period corresponded to the passage of the species from wild to cultivated plants in Guatemala, the further, to the presence of a bottleneck period at each introduction events: between Guatemala and Costa Rica and between Costa Rica and Venezuela. For the second step the most likely scenario was the number 7 (introduction of individuals from Costa Rica to Ecuador, followed by a bottleneck period) the third step supports scenario 13 (introduction of individuals from Costa Rica to Canary Islands followed by a bottleneck period) (fig 6).

We present the estimation of parameters only for the final scenario validated. The mean, median, mode and the quantiles values for the scenario 13 are presented in Table 3. Posterior distribution supports an effective population size values around 8×10^3 and 9×10^3 individuals for the mean, median, mode, and 95% quantile. With around 6×10^3 individuals for 25% and 50% quantiles, the number of founders for the first bottleneck (passage of the species from wild to cultivated plants in Guatemala) was larger than for the others bottlenecks experienced by *T. solanivora* across the invasion process. Nevertheless there was a important dispersion of values: for NF1 the mean and median were 190 and 160 individuals, the mode, 25% and 50% quantiles were of 8, 7 and 13 individuals whereas 95% quantil was 448 individuals. The number of founders introduced from Guatemala to Costa Rica NF2 was:

median, mode, and quantiles 25% and 50% values were between 5 and 15 individuals, and mean and quantile 95% were 32 and 113 individuals respectively. A larger number of founders have been estimated for the introduction of individuals from Costa Rica to Venezuela NF3, mode and quantiles 25% and 50% were between 13 and 29 individuals. Mean 115 individuals and quantile 95% 357 individuals. A very small number of founders were estimated for the last two introduction events: Individuals from Costa Rica introduced to Ecuador NF4, and individuals from Costa Rica introduced to Canary Islands NF5. For NF4 mean, mode, and quantiles 25% and 50% were from 5 to 10 individuals, with mean and 95% quantil of 9 and 29 individuals respectively. For NF5 median, mode, and quantiles 25% and 50% slightly varied from 2 to 4, with mean of 9 individuals and a 95% quantil of 29 individuals.

Discussion

Genetic variation along the invasion process

The reduction of the genetic diversity in invasive populations during the colonization process has been reported in many studies (Grapputo *et al.* 2005, Pruett & Winker 2005, Dlugosch & Parker 2008, Puillandre *et al.* 2008). This is also the case for *Tecia solanivora*. Ours results showed that microsatellite alleles were lost during the invasion whereas the alleles present in high frequency in the area of origin, were maintained in the invaded area. Such a phenomemon could be explained by the fact that the probability for an allele to spread into invasive populations is related to its frequency (Rollins *et al.* 2009). The decrease in the mean number of alleles and in the heterozygosity level was related with time lag since the first report of occurrence of the invasive species in its country of origin. Measures of genetic diversity were highest in Costa Rica and Venezuela the first two invaded countries, and on the

contrary lowest in Ecuador and Canary Islands, the two last established populations. The same relationship between diversity loss and signaling dates has been previously observed in invasive species (Wares *et al.* 2005, Dlugosch & Parker 2008, Rollins *et al.* 2009) and can be explained by the occurrence of successive bottlenecks during the invasion process. In our case the statistical comparison of the mean number of alleles per locus between populations across the invasion range suggests the presence of two bottlenecks. The first one occurs between Guatemala and (Costa Rica and Venezuela) and the second one between either of those two countries and (Ecuador and Canary Islands populations). As expected the reduction in the heterozygosity (H_e) was less important than the reduction in the mean number of alleles. Allelic richness is generally predicted to be more sensitive to founder effects than heterozygosity (Nei *et al.* 1975, Allendorf 1986, Leberg 1992).

The Wilcoxon test detected only a bottleneck in Canary Islands population. The method assumes that when a population is experiencing a recent reduction of its effective population size it exhibits a correlative reduction of the allele number and of the heterozygosity but as indicated before the allele numbers is reduced faster than the genetic diversity (H_e , or Hardy-Weinberg heterozygosity). In consequence the observed genetic diversity is higher than the expected genetic diversity at equilibrium (calculated from the observed number of alleles, under the assumption of a population in constant size equilibrium) (Luikart *et al.* 1998). Nevertheless after some generations the population would reach the equilibrium again making impossible the detection of heterozygosity excess. Thus with such a method we can only detect the size reduction of the last introduced population that had not enough generations since its introduction to remove the bottleneck signal.

The F_{ST} values, also suggest the presence of founder events across colonization events and the action of genetic drift in new established population (Cornuet & Luikart 1996). The genetic divergence increased from the source population to the most recent population

established. Such a situation has been observed before (Le Corre & Kremer 1998; Pruett & Winker 2005). The low F_{ST} values between population from Guatemala and Costa Rica, and between Costa Rica and Venezuela indicated a first series of colonization events step by step: introduction of individuals from Guatemala to Costa Rica and from Costa Rica to Venezuela. The lowest F_{ST} values between Costa Rica and the rest of the invaded countries suggest a second phase of colonization by independent introductions from Costa Rica to Ecuador and Costa Rica to Canary Islands. STRUCTURE results and NJ tree are agreeing with the fact that individuals from Costa Rica could have invaded Venezuela, the high differentiation of the Ecuadorian and Canary Islands populations does not permit to clearly identify their source population.

Comparison of invasion scenarios and parameters estimation using Bayesian approach.

Among all the possible sources for each introduction, and among the scenario with or without bottleneck, the scenario better supported by DIY ABC inference was the scenario 13 (Table 2). It assumed an initial bottleneck corresponds to the passage of the species from wild to cultivated plants in the origin area (Guatemala), then introduction of individuals from Guatemala to Costa Rica, and finally three independent introductions of individuals coming from Costa Rica and introduced to Venezuela, to Ecuador and to Canary islands. The presence of a bottleneck at each introduction was also supported. The scenario is congruent with the rest of the results presented above. This is also the case for the estimation of the number of founder introduced in each invasion step: indeed the number seems to be higher at first steps of the colonization process and lowest in the countries colonized recently. Effective

population size of *Tecia solanivora* is likely to be large (Niño personal communication), an information that is congruent with the estimation of this demographical parameter.

The historical data are congruent with the genetic results for the first steps of the invasion: we can assume that *T. solanivora* arrived to Costa Rica at the end of the 60's or at the beginning of the 70's when almost all the potatoes production of Guatemala was exported to the Central American countries and especially to Costa Rica and Honduras (Cifuentes, 1980; Christiansen 1980), indeed at the same time most of the potato crops of Costa Rica were destroyed by the species. Then an introduction of infested seeds from Costa Rica to Venezuela is reported in 1983, this introduction is well documented (Salazar & Escalante 1984; Torres 2003; Niño 2004). Our results showed a genetic similarity between the populations from the two countries, data analysis suggested the introduction of a relatively high number of individuals (compared to the others introductions) from one country to the other. (Salazar & Escalante 1984; Torres 2003; Niño 2004). In 1996 *T. Solanivora* was reported in Ecuador (Gallegos *et al.* 1997) In the literature the species seems to have widened its colonization range through the neighbor South American countries (Venezuela to Colombia and Colombia to Ecuador). Our genetic analysis is not congruent with such a pattern. The genetic analyses suggest that the population source of Ecuadorian populations is Costa Rica. This is the same case for the population of Canary Islands, for which literature data reported the introduction of the species from a South American country most likely Venezuela in 1999 (EPPO 2006). It is not the first time that genetic information is contradictory with historical data (Ciosi *et al.* 2008), even if there are no records of commercial exchanges between Costa Rica and Ecuador and Costa Rica and Canary Island an illegal introduction (of a few quantity of potatoes that could escape to custom controls) could be possible, this hypothesis is supported by the estimation of a very low number of founder for this two introductions.

The study of the source and pathways of biological invasions is crucial to understand and manage biological invasions. Informations about source and pathways can be obtained from direct and indirect data (like control in airports, historical data, dispersion hypotheses etc) (Suarez *et al.* 2001) Nevertheless there is often a lack of accuracy in those information. In our case the genetic analyze of *Tecia solanivora* populations contradicts the hypothetical scenario of invasion built from historical records. The traditional genetic methods of analyses and the ABC methodology were very useful to discriminate between complex invasion scenarios. In addition ABC analyzes gave insights into demographical parameters that can influence the success of invasions. Once more population's genetic analysis appears as a useful tool to track different questions about the invasion process.

Figures

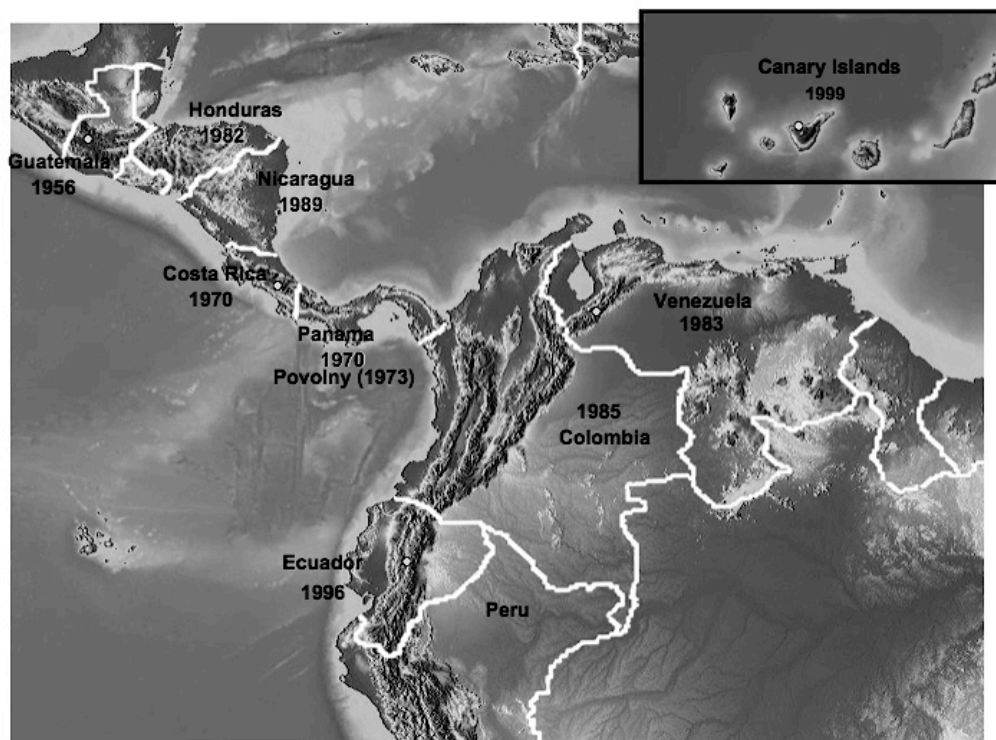


fig 1. Signaling date of apparition of *Tecia solanivora*.

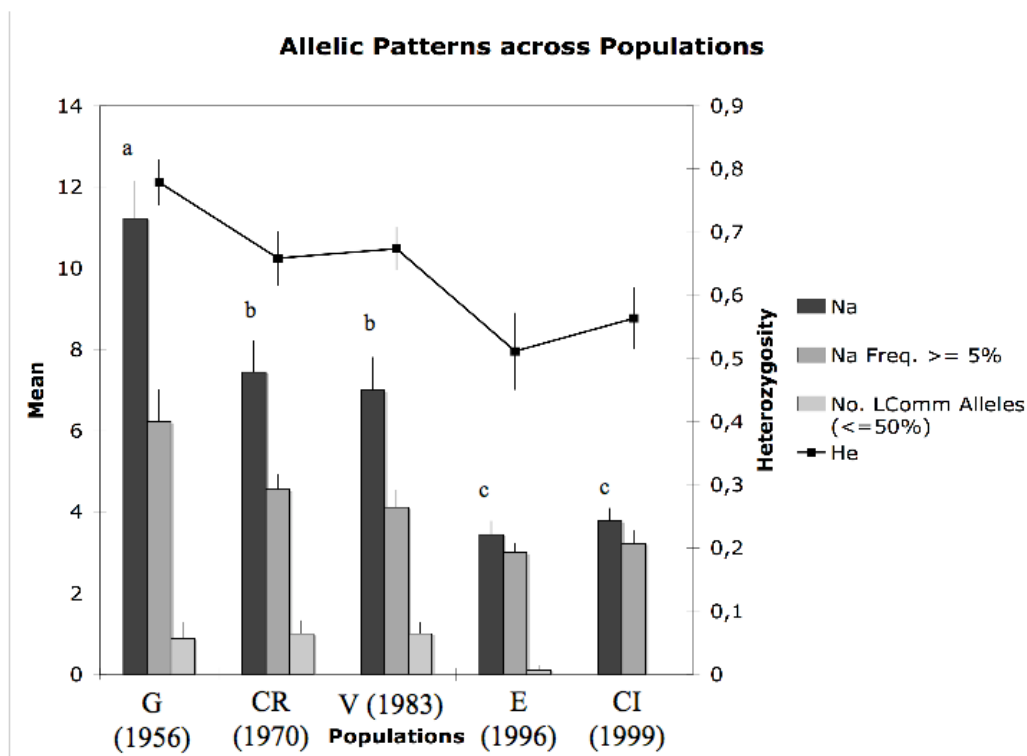


fig 2. Allele patterns across populations. G: Guatemala, CR: Costa Rica, V: Venezuela, E: Ecuador, CI: Canary Island, signaling date of the species in the country, Na: mean of number of alleles, Na Freq $\geq 5\%$ mean of number of alleles with frequency superior of 5%, No Less common alleles, He: Heterozygosity,



fig 3. Bayesian inference of population clusters using STRUCTURE. Bars are partitioned into K shaded segments proportional to the inferred ancestry of each individual to each cluster. 1: Guatemala, 2: Costa Rica 3: Venezuela, 4: Ecuador, 5: Canary Islands.

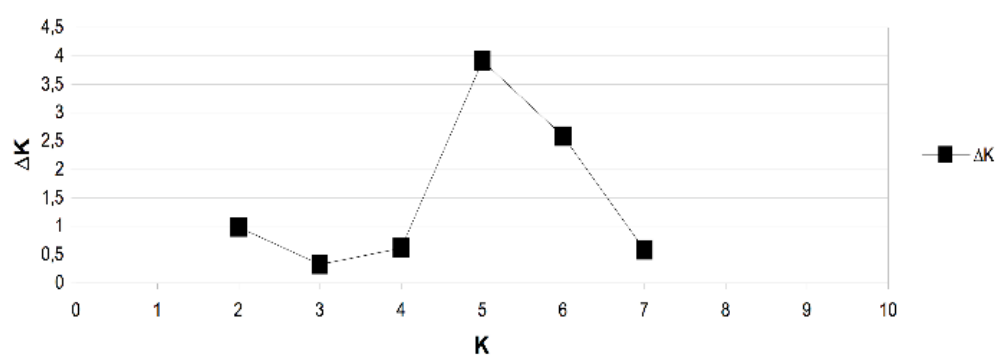


fig 4. Estimation of the number of genetic clusters from Evanno *et al.* (2005).

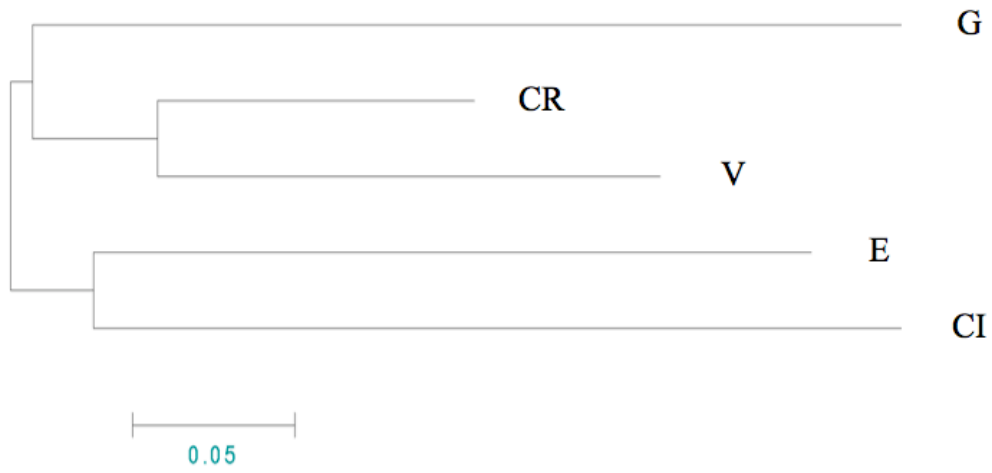


fig. 5 Neighbour-joining tree based on the chord distance of Cavalli-Sforza & Edwards (1967).

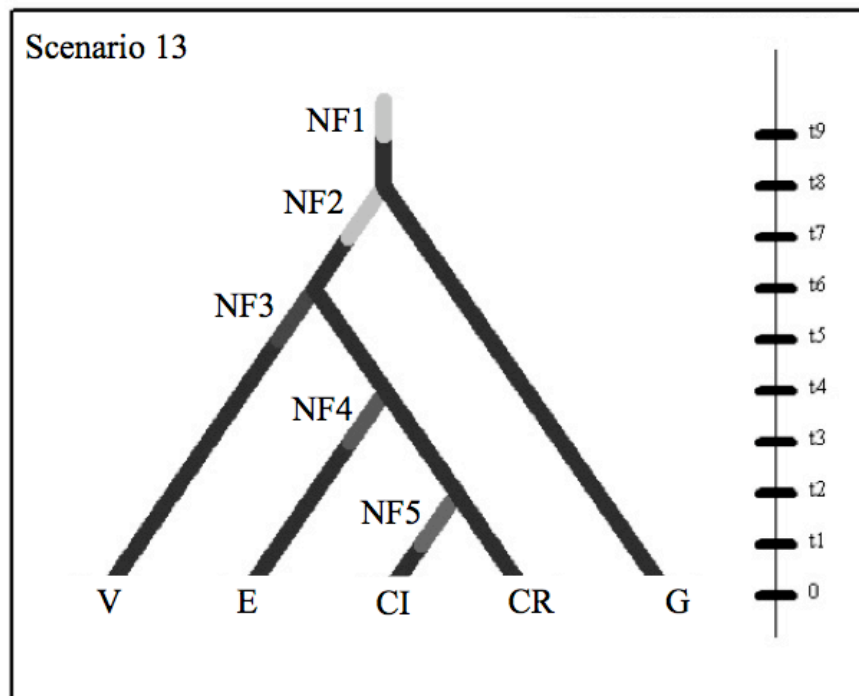


fig 6. Best supported scenario. G: Guatemala population, CR: Costa Rica population, V: Venezuela population, E: Ecuador population, CI: Canary Islands population. NF1: number of individuals that passed from wild to cultivated plants in G, NF2: number of founders introduced from G to CR, NF3: number of founders introduced from CR to V, NF4: number of founders introduced from CR to E, NF5: number of founders introduced from CR to CI

Tables

	G	CR	V	E
CR	0.0699***			
V	0.0942 ***	0.0497***		
E	0.1697***	0.0931***	0.1866***	
CI	0.1372***	0.1135***	0.1885***	0.1926***

Table 1. Pairwise F_{ST} comparisons between populations, G: Guatemala, CR: Costa Rica, V: Venezuela, E: Ecuador, CI: Canary Islands.

Step one	
Scenario 1	<i>b1-G→b2-CR→b3-V</i>
Scenario 2	scenarios 1 without bottlenecks
Scenario 3	G→b2-CR→b3-V
Scenario 4: Two independent introductions	b1-G→b2-CR b1-G→b3-V
Scenario 5	scenarios 4 without bottlenecks
Step two	
Scenario 6	scenario 1 and b1-G→b4-E
Scenario 7	<i>scenario 1 and b2-CR→b4-E</i>
Scenario 8	scenario 1 and b3-V→b4-E
Scenarios 9, 10, 11	scenarios 6, 7, 8 without bottlenecks
Step three	
Scenario 12	scenario 7 and b1-G→b5-CI
Scenario 13	<i>scenario 7 and b2-CR→b5-CI</i>
Scenario 14	scenario 7 and b3-V→b5-CI
Scenario 15	scenario 7 and b4-E→b5-CI
Scenarios 16, 17, 18	scenarios 12, 13, 14, 15 without bottlenecks
Scenario 19	scenario 7 and admx(CR-V)→b5-CI
Scenario 20	scenario 7 and admx(CR-E)→b5-CI
Scenario 21	scenario 7 and admx(V-E)→b5-CI

Table 2. Scenarios tested with DIY ABC. G: Guatemala, CR: Costa-Rica, V: Venezuela, E: Ecuador, CI: Canary Islands; bi: bottleneck in ith country. i: country index, i=1 for Guatemala, i=2 for Costa-Rica, i=3 for Venezuela, i=4 Ecuador, i=5 Canary Islands; admx: admixture between two populations; → Introduction.

	mean	median	mode	Q25%	Q50%	Q95%
NS	8147	8344	8966	5302	5841	9790
NF5	9	4	3	2	2	29
NF4	16	10	8	4	5	34
NF3	115	75	29	13	17	357
NF2	32	15	8	5	5	113
NF1	189	159	8	7	13	448

Table 3: mean, median, mode and quantiles of posterior distribution for effective population sizes for the invasion scenario 13

Conclusion

Et

Perspectives

La génétique des populations et les invasions biologiques

L'utilisation des concepts et outils de la génétique des populations est essentielle dans le cadre de l'étude des invasions biologiques car cela permet de les caractériser et mieux les comprendre (voir introduction pour plus de détails pages 15 et 16). Les principales applications de la génétique des populations dans l'étude des invasions biologiques sont la *délimitation de la zone d'origine de l'espèce*, *l'identification de la ou des populations sources* de l'invasion, *la description des scénarios d'invasion* et *la caractérisation des changements génétiques* suivis par l'espèce lors du processus invasif (Sakai *et al.* 2001; Wares *et al.* 2005; Dlugosch & Parker 2008; Puillandre *et al.* 2008; Ciosi *et al.* 2008).

L'information issue des analyses génétiques peut être utilisée pour *limiter les dégâts écologiques et/ou économiques* occasionnés par les espèces invasives ainsi que pour *comprendre des processus évolutifs* liées au succès invasif (Roderick & Navajas 2003; Baliraine *et al.* 2004; Kolbe *et al.* 2004; Sax *et al.* 2007; Ahern *et al.* 2009; Cognato *et al.* 2005, Rosenthal *et al.* 2008, Rollins *et al.* 2009).

Délimitation de la zone d'origine de *Tecia Solanivora*

Le premier des objectifs de cette thèse était de **délimiter la zone d'origine** de *Tecia solanivora* (voir chapitre I). Dans notre cas, les données historiques et événementielles ne permettaient pas de définir précisément la zone d'origine de ce ravageur de la pomme de terre. J'en veux pour preuve le nom vernaculaire de *T. solanivora* qui est appelée mite centre américaine de la pomme de terre ou mite Guatémaltèque (EPPO 2005, Zhang 1994). Nous nous devions donc préciser si *T. solanivora* était originaire de toute l'Amérique centrale ou uniquement du Guatemala. Pour répondre à cette question nous avons choisi deux pays d'Amérique Centrale susceptibles de constituer la zone d'origine de l'espèce, ou au moins d'en faire partie : le Guatemala et le Costa Rica. Ces pays ont été choisis en raison de leurs caractéristiques écologiques similaires favorables au développement de *T. solanivora* (voir pages 17 et 18) (présence de zones d'altitude, température adéquate, etc.). De plus, ces pays sont les seuls pays d'Amérique Centrale à assurer une production de pommes de terre suffisante pour permettre une expansion démographique de *T. solanivora*. De part leurs positions géographiques, le Guatemala pourrait être la limite nord de la zone d'origine et le Costa Rica la limite sud (voir Fig 7 pag 25).

Dans le chapitre I nous décrivons comment à l'aide du marqueur mitochondrial nous avons pu préciser l'aire d'origine du ravageur *via* l'analyse de populations échantillonnées au Guatemala dans deux des principales régions productrices de pomme de terre du pays (Huehuetengo et Quetzaltenago) ainsi que dans la région responsable de l'essentiel de la production au Costa Rica (Cartago) (voir Fig. 7 page 25). Nos résultats indiquent que **le Guatemala ferait partie de la zone d'origine** de *T. solanivora*. En effet, toutes les populations

de ce pays se caractérisent par une **forte diversité génétique** et semblent être plus en **équilibre démographique** que dans une phase d'expansion.

Les analyses des populations du Costa Rica indiquent que ce pays fait partie de la **zone d'invasion de l'espèce**. En effet, les populations du Costa Rica montrent une forte perte de diversité génétique comparativement aux populations du Guatemala et paraissent avoir connu une **expansion démographique**. Les analyses de variance moléculaire confirment ce résultat en intégrant les populations du Costa Rica dans la zone envahie. Nos résultats concernant ce pays confirment donc les hypothèses qui avaient été émises sur la base des relevés temporels de dégâts dus à *T. solanivora* en Amérique Centrale.

Limite sud de la zone d'origine

Il semble qu'une expansion naturelle de l'aire de distribution de *T. solanivora* vers le sud à partir du Guatemala n'ait pas eu lieu. La zone pouvant potentiellement abriter des espèces de plante hôte sauvages n'est pas limitrophe du Guatemala (voir Fig 1 et Fig 2).

Des **conditions agro-écologiques défavorables** au Salvador, au Honduras et au Nicaragua pourraient expliquer l'absence de propagation naturelle. Tout d'abord, les zones de hautes altitudes propices au développement de *T. solanivora* et à la culture de pomme de terre dans ces pays sont réduites, de plus la culture de pomme de terre n'est pas intensive (voir Fig 7 page 25), ce qui limite la disponibilité de la ressource pour *T. solanivora* qui rappelons-le est aujourd'hui strictement inféodée à cette plante.

L'espèce aurait donc pu être introduite dans les pays d'Amérique Centrale *via* les **exportations abondantes** qui ont eu lieu entre le Guatemala et ces pays à la fin des années 60 et au début des années 70 (Cifuentes 1980; Christiansen 1980; ICTA 1977).

Limite nord de la zone d'origine

Les régions productrices de pommes de terre au Guatemala sont limitrophes du Mexique. De plus, il existe un continuum écologique entre ces deux pays sous la forme d'une chaîne montagneuse appelée la « Sierra Madre » (voir Fig 1 et 2). Toutefois, la présence de *T. solanivora* n'a pas été signalée au Mexique. Le Chiapas, qui est la région limitrophe du Guatemala, ne produit que peu pommes de terre et la rareté de ce type de culture pourrait donc avoir limité l'expansion de *T. solanivora* au nord du Guatemala. En effet, les plus grandes régions productrices de pommes de terre au Mexique (Sonora et Guanajuato) se situent loin de la frontière avec le Guatemala, au nord et au centre du pays respectivement (Comision Veracruzana de Comercializacion Agropecuaria).

Même si la plante hôte sauvage originelle de *T. solanivora* n'est pas connue, il est imaginable qu'elle soit toujours présente dans la Sierra Madre et que se soit une Solanacée qui produise des tubercules, puisque *T. solanivora* ne se développe pas au dépens d'autres organes végétaux. Le développement de la culture de la pomme de terre au Guatemala aurait induit un *passage de l'espèce de la plante sauvage à la plante cultivée* en raison de l'importante ressource libre d'antagonistes que la plante cultivée représentait. Le fait que *T. solanivora* n'a pas été détecté au Mexique peut s'expliquer par sa *disparition du milieu sauvage* suite à son passage sur la plante cultivée (cas d'étude dans l'unité) soit par un *fort contrôle par des antagonistes* qui ont jusqu'ici rendu impossible sa détection.

L'étude de la structuration génétique des populations du Guatemala nous a permis d'identifier une éventuelle population source dans la région de Quetzaltenango. En effet, la population de cette région peut être différenciée de celle présente dans la seconde région étudiée (Huehuetenango). Il est possible que le relief, et notamment la présence d'une vallée

entre ces deux régions, ait joué le rôle de barrière écologique limitant le flux de gènes entre les deux populations.

En conclusion, le Guatemala (la région de la Sierra Madre) serait donc la zone d'origine de l'espèce.

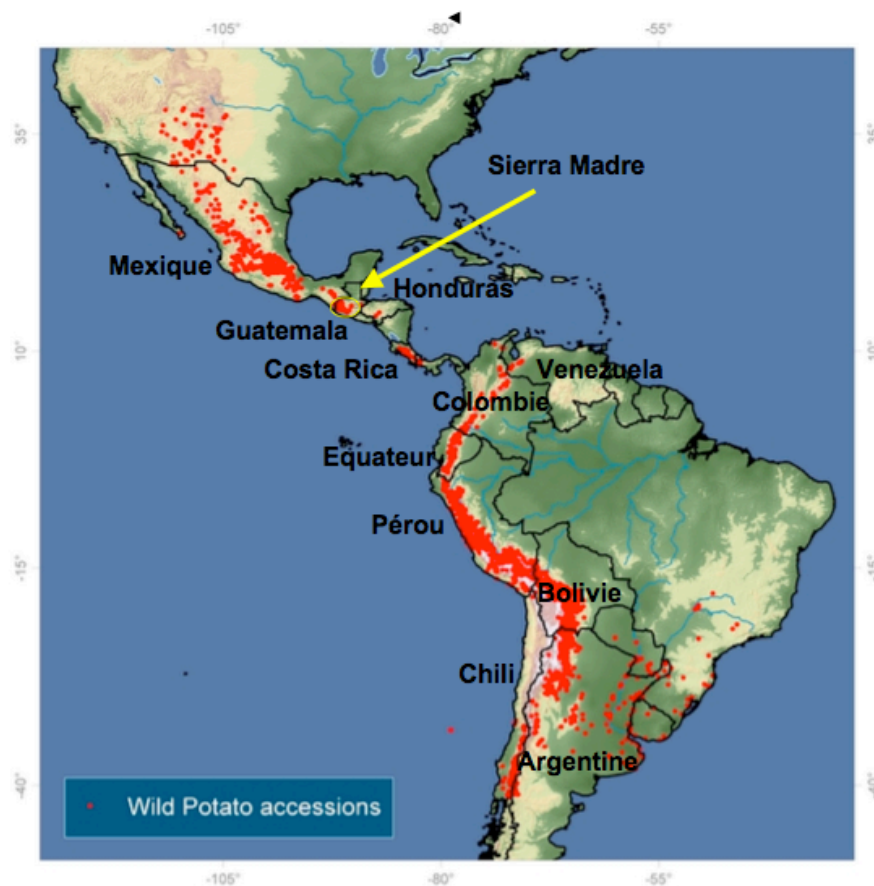


Figure 1 :Répartition des solanacées sauvages en Amérique Centrale et du Sud.

Source CIP



Figure 2 : Distribution des espèces de solanacées sauvages en Amérique

Centrale et du Sud. Source CIP.

Les routes d'invasion :

Données historiques de l'invasion de *Tecia solanivora*

En Amérique Centrale, *Tecia solanivora* est signalée pour la première fois au Guatemala en 1956 puis au Costa Rica et au Panama en 1970. Elle est également signalée en 1982 au Honduras et en 1989 au Nicaragua. En Amérique du Sud, *T. solanivora* est d'abord signalée au Venezuela en 1983, puis en Colombie en 1985 et enfin en Equateur en 1996. C'est en 1999 qu'elle est pour la première fois détectée en Europe aux Iles Canaries. Sa présence n'a pas été signalée dans d'autres pays. Les seules voies d'invasion clairement caractérisées dans la littérature correspondent à son introduction au Venezuela en 1983, suite à l'importation de semences infectées en provenance du Costa Rica (Salazar & Escalante 1984; Torres 2003; Niño 2004), et à son introduction aux Iles Canaries suite à l'importation illégale d'un sac de pommes de terre infestées provenant a priori d'Amérique du Sud (EPPO 2006) (voir Fig 6 page 25).

Scénario hypothétique initial établi à partir de la littérature

Les données historiques suggèrent comme nous l'avons vu une origine Guatémaltèque ou au moins centro-américaine de *Tecia solanivora*. Cependant nous ignorons si *T. solanivora* était native ou invasive dans l'ensemble de cette région. Son passage en Amérique du Sud se serait fait suite à l'introduction au Venezuela d'une population originaire du Costa Rica. Puis, l'espèce se serait rapidement propagée du nord au sud de la Colombie (pays frontalier avec le Venezuela). L'espèce se serait ensuite répandue dans toute la Colombie avant de se retrouver dans la zone limitrophe de l'Equateur (région de Carchi) suite à des

échanges transfrontaliers de pomme de terre. La source de la population des Iles Canaries serait probablement l'Amérique du Sud et plus particulièrement le Venezuela. En effet, l'EPPO suppose une introduction *via* un sac de pomme de terres en provenance du Venezuela, mais il n'existe pas de documentation précise à ce sujet. Nous avons donc cherché dans cette thèse à préciser les routes d'invasion grâce à des outils moléculaires (Fig 3).



Figure 3 : Route d'invasion supposée de *T. solanivora*

Confirmation ou infirmation des données historiques, les enseignements de l'étude génétique des populations :

Introduction d'individus du Guatemala vers le Costa Rica : confirmation des données historiques.

Comme cela a été précisé précédemment, les populations du Guatemala présentent des caractéristiques génétiques typiques d'une population source alors que celles du Costa Rica présentent des caractéristiques génétiques de population invasives. En effet, la variabilité génétique des populations du Guatemala est significativement plus élevée que celle du Costa Rica. Les résultats obtenus à l'aide du marqueur mitochondrial et de neuf locus microsatellites sont congruents. Nous avons trouvé des haplotypes qui sont partagés par les deux populations (voir page 82) ainsi que des allèles (voir page 123). Les valeurs de F_{ST} (voir page 128), de Φ_{IS} (voir page 87), la topologie en NJ, ainsi que la comparaison des scénarii d'introduction à l'aide méthodes bayésiennes vont également dans ce sens (voir page 124 à 129). L'ensemble de ces résultats indique donc qu'il y a eu une introduction de *T. solanivora* au Costa Rica à partir d'individus venant du Guatemala probablement à la fin des années 60 ou au début des années 70 lorsque le Guatemala, de part l'augmentation de sa production, a développé une politique d'exportation de pommes de terre vers les autres pays d'Amérique Centrale (Cifuentes 1980; Christiansen 1980).

Introduction d'individus du Costa Rica vers le Venezuela : confirmation des données historiques.

Cette étape est relativement bien documentée dans la littérature qui signale une importation, vers le Venezuela (voir page 23), de semences de pommes de terre de la variété ATZIMBA en provenance du Costa Rica. La dynamique des populations de *T. solanivora* dans ce pays a fait l'objet de plusieurs études. Cette fois encore, les données génétiques que nous avons obtenues confirment ce résultat. Au niveau mitochondrial, nous observons des haplotypes partagés par les populations de ces deux pays dont un haplotype très majoritaire et commun aux deux pays (voir page 82). Les populations de ces deux pays partagent des allèles et les valeurs de Φ_{is} (voir page 87) et de F_{ST} (voir page 128) sont plus petites entre le Costa Rica et le Venezuela qu'entre ces deux pays et le reste de la zone étudiée. De plus, la topologie NJ ainsi que les sorties du logiciel STRUCTURE indiquent des **populations génétiquement proches** (voir page 124 et 126). La comparaison des scénarii d'introduction à l'aide méthodes bayésiennes soutient aussi cette étape du scénario d'introduction.

Invasion de la Colombie, de l'Equateur et des Iles Canaries : infirmation des données historiques.

L'absence de diversité génétique au niveau mitochondrial a limité l'analyse des populations de ces trois pays (voir Chapitre I). Néanmoins, l'haplotype rencontré en Colombie, en Equateur et dans les populations des Iles Canaries est l'haplotype majoritaire présent au Costa Rica et au Venezuela (voir page 82). L'analyse de l'ensemble de données issues du marqueur mitochondrial (perte progressive de la diversité génétique) ainsi que les valeurs de Φ_{st} (toujours plus faibles entre les pays voisins qu'entre les pays ne possédant pas

de frontières communes) (voir page 87) nous conduit à supposer l'existence d'une **colonisation séquentielle** de *Tecia solanivora* de la région d'origine vers le Costa Rica puis vers le Venezuela, et ensuite, de proche en proche, vers la Colombie et l'Equateur. La provenance des individus qui ont été introduits aux Iles Canaries reste incertaine, mais compte tenu de la date de signalement de *T. solanivora* il semblerait que cette région ait été la dernière colonisée. Le scénario de colonisation séquentielle suivant les dates de signalement de *T. solanivora* dans chacun des pays, issu de l'utilisation du marqueur mitochondrial est en accord avec les données historiques recueillies.

Cependant, même si les analyses nucléaires n'ont pas été possibles sur les populations de Colombie en raison d'un problème d'échantillonnage, les analyses issues du génotypage des populations d'Equateur et des Iles Canaries semblent **contredire le scénario d'invasion proposé précédemment** (voir chapitre III) à partir des données historiques et des données mitochondriales. En effet, toutes les analyses nucléaires (pattern alléliques au sein des populations, F_{ST} et comparaison des scénarii d'introduction à l'aide méthodes bayésiennes) (voir page 123 à 129) indiquent que les populations d'Equateur et des Iles Canaries sont issues **d'évènements d'introduction indépendants à partir du Costa Rica** et non du Venezuela comme supposé précédemment. Le Costa Rica semble donc être la source de l'invasion de tous les pays d'Amérique du Sud et des Iles Canaries (voir Fig 4).

Le scénario d'invasion le plus probable semble donc être une première introduction au Costa Rica en provenance du Guatemala puis trois évènements d'introduction indépendants au Venezuela, en Equateur et aux Iles Canaries en provenance du Costa Rica.



Figure 4 : Route d'invasion de *T. solanivora* obtenue à partir des données d'ADN nucléaire

Variation de la diversité génétique au cours du processus d'invasion.

Zone d'origine (Guatemala)

Les analyses bayésiennes tendent à indiquer que la population locale de *Tecia solanivora* a subi un **goulot d'étranglement** probablement au moment du **passage de l'espèce d'une plante sauvage vers la plante cultivée** (page 127 et 129). De plus, les populations du Guatemala possèdent une forte variabilité génétique comparativement aux autres pays. Au niveau nucléaire, la variabilité est de 30 à 70% plus élevée en termes de nombre moyen d'allèle (voir page 123). Au niveau mitochondrial, la diversité génétique est également élevée puisque (voir page 83 et 84).

Zone envahie

La perte de diversité génétique lors du processus invasif peut se *diviser en deux étapes* : une première perte de diversité génétique chez les populations du Costa Rica et du Venezuela et une deuxième perte dans la zone Colombie (pour laquelle nous n'avons que des données mitochondriales), Equateur et Iles Canaries.

Costa Rica et Venezuela

Au niveau mitochondrial, les populations du Costa Rica présentent une réduction de leur diversité génétique comparativement aux populations du Guatemala.(voir page 83 et 84). Pour le compartiment nucléaire, la réduction exprimée en termes du nombre moyen d'allèles par locus est de l'ordre de 30% (voir page 123).

Pour le Venezuela, la diversité gentique diminue aussi (voir page 83 et 84). La réduction de la diversité génétique au niveau nucléaire est de l'ordre de 70% dans ce pays comparativement aux populations du Guatemala (voir page 123).

Les différences d'ordre de grandeur de la réduction génétique au niveau mitochondrial et au niveau nucléaire peut être lié à un artefact induit par les différences de tailles des échantillons. Par exemple, il y a eu deux fois plus d'individus séquencés pour le marqueur mitochondrial au Costa Rica qu'au Venezuela, alors que les analyses nucléaires ont été faites avec le même nombre d'individus.

Le goulot d'étranglement entre la zone d'origine et ces deux pays n'a pas été détecté par le logiciel BOTTLENECK probablement à cause des limites de la méthode utilisée.

L'estimation de paramètres démographiques par les méthodes bayésiennes comme le nombre de fondateurs indique un ***petit nombre de fondateurs au Costa Rica et un nombre important de fondateurs au Venezuela*** (voir page 130). Cependant la diversité génétique des populations de ces deux pays est ***équivalente*** (voir page 123). En effet, la diversité génétique des populations du Venezuela ne peut être supérieure à celle des populations du Costa Rica car ces dernières sont la source des populations du Venezuela. L'introduction au Venezuela d'un nombre plus élevé d'individus représentant la totalité de la diversité existante au Costa Rica pourrait expliquer pourquoi la diversité génétique est la même dans ces deux pays. Ce scénario semble envisageable car les données historiques indiquent une importation de semences d'assez grande ampleur du Costa Rica vers le Venezuela (Niño, com. pers.).

Colombie, Equateur et Iles Canaries

En dépit du grand nombre d'individus séquencés dans cette région (c.a. 160), les populations de ces trois pays ne possède ***qu'un seul et même haplotype mitochondrial*** (voir page 82). Au niveau nucléaire, la réduction de la variabilité génétique de la population d'Equateur et des Iles Canaries est d'environ 70% comparativement à la zone d'origine (Guatemala) et de 50% comparativement au Costa Rica et au Venezuela (voir page 123). Le logiciel BOTTLENECK n'a détecté qu'un seul goulot d'étranglement pour la populations des Iles Canaries probablement parce que cette population est la dernière population a avoir été introduite et qu'il n'y pas eu assez de nombre de générations depuis l'introduction pour lisser les effets et le signal d'un goulot d'étranglement. Les méthodes baysiennes ont permis d'estimer que le nombre de fondateurs pour l'introduction de *Tecia solanivora* en Equateur et aux Iles Canaries était faible (voir page 130). Même s'il ne semble pas exister d'échanges commerciaux officiels de pommes de terre entre le Costa Rica et le Venezuela ou entre le

Costa Rica et les Iles Canaries, une introduction illégale *via* des particuliers qui aurait échappée aux contrôles pourrait expliquer les résultats que nous avons obtenus.

Au cours du processus d'invasion, la ***réduction de la variabilité génétique semble être plus forte au niveau mitochondrial qu'au niveau nucléaire***, notamment pour les populations d'Equateur et des Iles Canaries. L'ADN mitochondrial est haploïde et est transmis par la mère. Son effectif efficace est quatre fois plus petit que celui d'un marqueur hérité de façon Mendélienne. La dérive génétique agit donc plus sur l'ADN mitochondrial que sur l'ADN nucléaire (voir pag 32). Ceci explique pourquoi il peut présenter une plus faible diversité génétique que l'ADN nucléaire. Le passage par de forts goulots d'étranglements comme cela semble être souvent le cas chez les populations invasives peut induire une réduction relative très marquée de la diversité mitochondriale. La perte de la diversité génétique au cours des processus d'invasion est un phénomène relativement courant (Puillandre 2008, Dlugosh 2008). Cette perte est probablement due au faible nombre d'individus introduits et à des processus évolutifs comme la dérive génétique qui est d'autant plus forte que les populations sont de tailles réduites. Un goulot d'étranglement démographique ainsi que la dérive génétique expliquerait la perte des allèles et des haplotypes rares lors du processus d'invasion. Une introduction plus importante en termes de nombre d'individus associée à un balayage sélectif pourrait également expliquer ces résultats.

La réduction de la diversité génétique a donc eu lieu en deux étapes : la première entre le Guatemala et l'ensemble Costa Rica, Venezuela, la deuxième entre le Costa Rica et le reste de la zone concernée (Colombie, Equateur, Iles Canaries).

Conclusion générale

L'analyse des deux compartiments du génome (mitochondrial et nucléaire) apparaît indispensable car ils n'évoluent pas de la même façon et peuvent donc apporter des **informations complémentaires** qui permettent de mieux décrire et comprendre le phénomène étudié. Dans notre cas, l'utilisation d'un marqueur mitochondrial s'est avérée particulièrement utile pour délimiter la zone d'origine de *Tecia solanivora* (le Guatemala). L'utilisation des deux compartiments du génome a permis de fournir des hypothèses alternatives concernant les routes d'invasion et a permis l'étude de la variabilité génétique de l'espèce au cours du processus d'invasion. L'utilisation des marqueurs microsatellites a apporté des informations supplémentaires notamment pour les populations d'Equateur et des Iles Canaries pour lesquelles les informations données par l'ADN mitochondrial se sont trouvées limitées de par l'absence de toute variabilité mitochondriale. Les nouveaux outils d'analyses développés pour l'étude des locus microsatellites se sont avérés très complémentaires par rapport aux analyses statistiques classiques pour permettre **une identification plus précise des routes d'invasion**. A ce niveau, l'utilité de l'utilisation combinée des marqueurs microsatellites et de l'analyse bayésienne, qui avait déjà été soulignée lors de l'étude d'autres espèces invasives pour lesquelles des scénarios d'invasion a priori évident avaient été remis en cause, a été ici confirmée. Ces nouveaux outils analytiques ont également été très utiles pour **estimer des paramètres démographiques clés** dans la compréhension des phénomènes d'invasion biologique tel que le nombre de fondateurs d'une population.

Tecia solanivora comme beaucoup d'espèces invasives est passée par des goulots d'étranglement génétique lors du processus de colonisation (voir chapitre I). La forte réduction de la variabilité génétique de ces espèces devrait avoir un effet négatif sur leur

fitness (Reed & Frankham 2003). Cependant, cela n'empêche pas leur succès démographique et écologique. (Frankham 2005). Il semblerait que ces pertes de diversité génétique ne prédisent pas la variation des traits quantitatifs, qui sont pour la majorité liées à des traits écologiques importants (Dlugosch & Parker 2008). Les espèces invasives présentant une forte réduction génétique sembleraient aussi garder assez de variance additive pour leur permettre de s'adapter à un nouvel environnement (Reed & Frankham 2001, Hanfling & Kollmann 2002, Hassan *et al.* 2003, Lindholm *et al.* 2005).

L'étude génétique telle que nous la présentons dans cette thèse souligne l'importance de s'intéresser aux espèces invasives qui ont subi un bottleneck génétique de grande amplitude (voir Chapitre I). En effet, les populations des Iles Canaries et d'Equateur ont été fondées par un très petit nombre d'individus (probablement moins d'une dizaine). Ceci démontre donc qu'une introduction de seulement quelques individus peut donner naissance à des populations pérennes et avec une croissance démographique forte. Cette thèse démontre donc l'importance de contrôler l'expansion des petites populations ou même de les éliminer car elles peuvent donner lieu à des populations plus grandes causant des dégâts écologiques et économiques importants. Il est donc aussi important de renforcer les contrôles aux frontières afin d'éviter l'introduction d'un nombre même faible d'individus.

Plusieurs éléments peuvent déterminer les trajectoires évolutives des espèces invasives : l'adaptation épigénétique ou les mutations adaptatives qui peuvent avoir lieu au cours de l'invasion (Perez *et al.* 2006), la dérive génétique (Tsutsui *et al.* 2002) ou la sélection (Wares *et al.* 2005). Jusqu'à présent, beaucoup d'études ont cherché à caractériser au niveau génétique les invasions biologiques (populations sources, routes d'invasion, etc.) mais un gros

effort d'investigation devrait être effectué pour étudier également les phénomènes adaptatifs qui sont à la base du succès démographique des espèces invasives.

Perspectives

Pour compléter ce travail de thèse, il serait intéressant d'échantillonner une ou plusieurs populations de Colombie afin de les inclure dans nos analyses et voir dans quelle mesure ces données pourraient modifier certains des résultats obtenus. Nous pourrions également échantillonner d'autres populations qui auraient pu jouer un rôle dans le scénario d'invasion (Colombie, Honduras, Nicaragua) et voir si les routes d'invasion proposées ici sont confirmées. Enfin, un complément important de ce travail de thèse serait d'utiliser la nouvelle version du logiciel DIY ABC en cours de finalisation (Cornuet, com. pers.) pour analyser simultanément les données nucléaires et mitochondriales.

Une des autres perspectives qu'offre cette thèse serait d'inclure les données génétiques dans des modèles de dispersion de l'espèce. Cela permettrait de compléter les résultats déjà obtenus par notre laboratoire (automates cellulaires (Dangles & Carpio, com. pers.)). Améliorer le pouvoir prédictif de ces modèles pourrait par exemple aider à l'évaluation du risque d'entrée par des voies naturelles de *Tecia solanivora* au Pérou, dans d'autres pays andins, ou même dans certains pays d'Europe continentale.

D'autre part, dans cette thèse nous n'avons utilisé les loci microsatellites uniquement pour comparer les différents scénarii d'invasion de *T. solanivora* et pour démontrer une réduction de la variabilité génétique au cours du processus invasif. Toutefois, les possibilités d'exploitation de cet outil moléculaire sont plus vastes. D'autant plus que nous sommes une des rares équipes à l'échelle internationale à avoir réussi à surmonter les difficultés liés à l'isolation de ces marqueurs chez les lépidoptères. Nous avons réussi à isoler 9 loci sans

allèles nuls, et donc à l'équilibre d'Hardy-Weinberg, et surtout à utiliser ces marqueurs dans le cadre d'une étude de génétique des populations à grande échelle. Nous pourrions donc essayer d'approfondir l'analyse des populations de *T. solanivora* au niveau nucléaire. Nous pourrions analyser la structure génétique des différentes populations au sein de chaque pays en utilisant notamment des populations qui ont été récoltées pendant la thèse mais qui n'ont pas été analysées jusqu'à présent puisque leur inclusion dans la démarche DIY ABC n'était pas nécessaire. Cette analyse pourrait permettre de détecter une éventuelle structuration génétique de *T. solanivora* au sein de chaque pays. En utilisant les informations disponibles sur les différents échanges commerciaux de pommes de terre, nous pourrions essayer de déterminer si cette structuration génétique, si elle existe, est liée à ces échanges commerciaux.

D'autre part, mieux caractériser les différentes populations pourrait s'avérer d'une grande utilité pour la mise en place de programmes de lutte biologique. Par exemple, dans le cas d'une utilisation de virus entomopathogènes vis-à-vis des populations de la zone envahie, une meilleure connaissance de la structure génétique permettrait de connaître quelle seraient les populations les plus susceptibles d'être contrôlées par un virus donné. Par exemple, des travaux issus de notre laboratoire ont montrés que des souches de vacuovirus provenant de populations en Colombie était plus efficaces pour le contrôle biologique que des souches commerciales (Zeddami & Lery com. pers.).

Finalement, la culture de pomme de terre en Amérique Latine est distribuée le long d'un gradient altitudinal très large (de 1800 jusqu'à 4200m au-dessus du niveau de la mer). De part les caractéristiques du relief, la culture de la pomme de terre en Amérique Centrale se fait à plus basse altitude qu'en Amérique du Sud. *T. solanivora* étant strictement inféodé à la pomme de terre, il serait intéressant de comparer différentes populations de l'espèce en fonction d'un gradient altitudinal ou de comparer des populations échantillonnées à la même altitude mais dans des pays différents d'Amérique Centrale et d'Amérique du Sud. Cela

pourrait permettre de mieux comprendre le défi adaptatif qu'a dû relever l'espèce pour s'adapter aux conditions de culture à haute altitude. *En effet, nous pourrions nous attendre à une perte de diversité liée à la montée en altitude.* Si tel est le cas, nous pourrions relier les comportements de déplacement de *T. solanivora* à des modèles climatiques. Nous pourrions par exemple nous attendre à ce que le réchauffement climatique induise une montée en altitude des populations présentes à basse altitude et des déplacements des populations déjà présentes à haute altitude. D'autre part, de précédentes études écologiques ont lié au gradient altitudinal des différences phénotypiques au niveau de la morphologie des ailes (Herrera 2007). Il serait intéressant de tester l'existence d'une relation entre ces attributs phénotypiques et les caractéristiques génétiques des populations

Notre laboratoire travaille sur trois axes fondamentaux directement liés à l'étude des processus d'invasion et notamment celui de *T. solanivora* : la génétique des populations, l'écologie et la virologie. Une des perspectives qu'offre cette thèse, de part les éléments qu'elle apporte à la compréhension des phénomènes invasifs, mais aussi de part les thématiques du laboratoire dans lequel elle a été réalisé, est le couplage des données de génétique des populations avec celles issues d'autres disciplines afin d'améliorer la compréhension des phénomènes d'invasion. Un tel effort d'intégration est en cours dans notre groupe de recherche grâce notamment à la disponibilité d'outils descriptifs et analytiques tels que les différents marqueurs moléculaires mis au point au cours de cette étude. Une telle approche pluridisciplinaire doit permettre d'une part une meilleure connaissance des espèces invasives et par conséquent une amélioration de la compréhension des phénomènes d'invasion et d'autre part ouvrir mieux la voie à l'étude des processus adaptatifs chez ces organismes.

Bibliographie

1. Abdelkrim, J., Pascal, M. & Samadi, S. (2005) Island colonization and founder effects: the invasion of the Guadeloupe islands by ship rats (*Rattus rattus*). *Molecular Ecology*, 14, 2923–2931.
2. Ahern, R.G., Hawthorne, D.J. & Raupp, M.J. (2009) Founder effects and phenotypic variation in *Adelges cooleyi*, an insect pest introduced to the eastern United States. *Biological Invasions*, 11, 959–971.
3. Allendorf, F.W. (1986) Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. *Zoo biology*, 5, 181–190.
4. Amsellem, L., Noyer, J.L., Le Bourgeois, T. & Hossaert-McKey, M. (2000) Comparison of genetic diversity of the invasive weed *Rubus alceifolius* Poir. (Rosaceae) in its native range and in areas of introduction, using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Molecular Ecology*, 9, 443–455.
5. Astaneï, L., Gosling, E., Wilson, J.I.M. & Powell, E. (2005) Genetic variability and phylogeography of the invasive zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (Pallas). *Molecular Ecology*, 14, 1655–1666.
6. Bachelet, G., Simon-Bouhet, B., Desclaux, C., Garcia-Meunier, P., Mairesse, G., de Montaudouin, X., Raigne, H., Randriambao, K., Sauriau, P.G. & Viard, F. (2004) Invasion of the eastern Bay of Biscay by the nassariid gastropod *Cyclope neritea*: origin and effects on resident fauna. *Marine Ecology Progress Series*, 276, 147–159.
7. Baliraine, F.N., Bonizzoni, M., Guglielmino, C.R., Osir, E.O., Lux, S.A., Mulaa, F.J., Gomulski, L.M., Zheng, L., Quilici, S., Gasperi, G. & Malacrida, A.R. (2004) Population genetics of the potentially invasive African fruit fly species, *Ceratitis rosa* and *Ceratitis fasciventris* (Diptera : Tephritidae). *Molecular Ecology*, 13, 683–695.
8. Barreto, N., Espitia, E., Galindo, R., Sanchez, N., Suarez, A. & Lopez-Auila, A. (2003) Determinacion de parametros reproductivos y habitos de *Tecia solanivora*

- (Povolny 1973) (Lepidoptera: Gelechiidae) en condiciones de laboratorio y campo. Tecia Solanivora II Taller Nacional/Memorias, pp31-36.
9. Beaumont, M.A. & Rannala, B. (2004) The Bayesian revolution in genetics. *Nature review genetics*, 5, 251-261.
 10. Beaumont, M.A., Zhang, W.Y. & Balding, D.J. (2002) Approximate Bayesian computation in population genetics. *Genetics*, 162, 2025-2035.
 11. Birungi, J. & Munstermann, L. (2002) Genetic structure of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) populations based on mitochondrial ND5 sequences: evidence for an independent invasion into Brazil and United States. *Annals of the Entomological Society of America*, 95, 125–132.
 12. Blum, M.J., Sloop, C.M., Ayres, D.R. & Strong, D.R. (2004) Characterization of microsatellite loci in *Spartina* species (Poaceae). *Molecular Ecology Notes*, 4, 39–42.
 13. Bonizzoni, M., Guglielmino, C.R., Smallridge, C.J., Gomulski, M., Malacrida, A.R. & Gasperi, G. (2004) On the origins of medfly invasion and expansion in Australia. *Molecular Ecology*, 13, 3845–3855.
 14. Bonizzoni, M., Zheng, L., Guglielmino, C.R., Haymer, D.S., Gasperi, G., Gomulski, L.M. & Malacrida, A.R. (2001) Microsatellite analysis of medfly bioinfestations in California. *Molecular Ecology*, 10, 2515–2524.
 15. Bosa, C.F., Prado, A.M.C., Fukumoto, T., Bengtsson, M. & Witzgall, P. (2005) Pheromone-mediated communication disruption in guatemalan potato moth, *T. solanivora*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 114, 137–142.
 16. Bossdorf, O., Auge, H., Lafuma, L., Rogers, W., Siemman, E. & Prati, D. (2005) Phenotypic and genetic differentiation between native and introduced plant populations. *Oecologia* 144, 1-11.

17. Bryan, M.B., Zalinski, D., Filcek, K.B., Libants, S., Li, W. & Scribner, K.T. (2005) Patterns of invasion and colonization of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*) in North America as revealed by microsatellite genotypes. *Molecular Ecology*, 14, 3757–3773.
18. Bucciarelli, G., Golani, D. & Bernardi, G. (2002) Genetic cryptic species as biological invaders: the case of a Lessepsian fish migrant, the hardyhead silverside *Atherinomorus lacunosus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 273, 143–149.
19. Buczkowski, G., Vargo, E.L. & Silverman, J. (2004) The diminutive supercolony: the Argentine ants of the southeastern United States. *Molecular Ecology*, 13, 2235–2242.
20. Calmet, C., Pascal, M. & Samadi, S. (2001) Is it worth eradicating the invasive pest *Rattus norvegicus* from Molène archipelago? Genetic structure as a decision-making tool. *Biodiversity and Conservation*, 10, 911–928.
21. Carroll, S.P. & Dingle, H. (1996) The biology of post-invasion events. *Biological Conservation*, 78, 207–214.
22. Cavallis, L.L. & Edwards, A.W.F. (1967) Phylogenetic analysis models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics*, 19, 233.
23. Christiansen, J.A. (1980) Memorias del primer curso nacional de la papa. Sector publico agrícola: ICTA programa regional cooperativo de la papa. Guatemala
24. Ciosi, M., Miller, J., Kim, K., Giordano, R., Estoup, A. & Guillemaud, T. (2008) Invasion of Europe by the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*: multiple transatlantic introductions with various reduction of genetic diversity. *Molecular Ecology*, 17, 3614–3627.

25. Cifuentes, J.E. (1980) Certificación de semilla de papa en Guatemala. Memorias del primer curso nacional de la papa. Sector publico agrícola, ICTA, programa regional cooperativo de la papa. Guatemala 43-46
26. Clegg, S., Degnan, S., Kikkawa, J., Moritz, C., Estoup, A. & Owens, I. (2002) Genetic consequences of sequential founder events by an island-colonizing bird. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 81-27.
27. Clement, M., Posada, D. & Crandall, K.A. (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9, 1657–1660.
28. Cognato, A.I., Sun, J.H., Anducho-Reyes, M.A. & Owen, R.D. (2005) Genetic variation and origin of red turpentine beetle (*Dendroctonus valens* LeConte) introduced to the People's Republic of China. *Agricultural and Forest Entomology*, 7, 87-94.
29. Colautti, R. & Macisaac, H. (2004) A neutral terminology to define 'invasive' species. *Diversity & Distribution*, 10, 135-141.
30. Colautti, R.I., Manca, M., Viljanen, M., Ketelaars, H.A.M., Burgi, H., Macisaac, H.J. & Heath, D.D. (2005) Invasion genetics of the Eurasian spiny waterflea: evidence for bottlenecks and gene flow using microsatellites. *Molecular Ecology*, 14, 1869–1879.
31. Colautti, R. & Richardson, D. (2009) Subjectivity and flexibility in invasion terminology: too much of a good thing? *Biological Invasions*, 11, 1225–1229.
32. Collins, T.M., Trexler, J.C., Nico, L.G. & Rawlings, T.A. (2002) Genetic diversity in a morphologically conservative invasive taxon: multiple introductions of swamp eels to the Southeastern United States. *Conservation Biology*, 16, 1024–1035.
33. Cornuet, J.M., Piry, S., Luikart, G., Estoup, A. & Solignac, M. (1999) New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics*, 153, 1989-2000.

34. Cornuet, J.M., Santos, F., Beaumont, M.A., Robert, C.P., Marin, J.M., Balding, D.J., Guillemaud, T. & Estoup, A. (2008) Inferring population history with DIY ABC: a user-friendly approach to approximate Bayesian computation. *Bioinformatics*, 24, 2713-2719.
35. Cornuet, J.M. & Luikart, G. (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144, 2001-2014.
36. Crawley, M., Harvey, P. & Purvis, A. (1996) Comparative ecology of the native and alien floras of the British Isles. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences*, 351, 1251-1259.
37. Cristescu, M.E.A., Hebert, P.D.N., Witt, J.D.S., MacIsaac, H.J. & Grigorovich, I.A. (2001) An invasion history for *Cercopagis pengoi* based on mitochondrial gene sequences. *Limnology & Oceanography*, 46, 224-229.
38. Cristescu, M.E.A., Witt, J.D.S., Grigorovich, I.A., Hebert, P.D.N. & MacIsaac, H.J. (2004) Dispersal of the Ponto-Caspian amphipod *Echinogammarus ischnus*: invasion waves from the Pleistocene to the present. *Heredity* 92, 197-203.
39. Daguin, C., Voisin, M., Engel, C. & Viard, F. (2005) Microsatellites isolation and polymorphism in introduced populations of the cultivated seaweed *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae, Laminariales). *Conservation Genetics*, 6, 647-650.
40. Dangles, O., Carpio, C., Barragan, A.R., Zeddari, J.L. & Silvain, J.F. (2008) Temperature as a key driver of ecological sorting among invasive pest species in the tropical Andes. *Ecological Applications*, 18, 1795-1809.
41. Dangles, O., Mesias, V., Crespo-Perez, V. & Silvain, J.F. (2009) Crop damage increases with pest species diversity: evidence from potato tuber moths in the tropical Andes. *Journal of Applied Ecology*, 46, 1115-1121.

42. Davis, M. & Thompson, K. (2000) Eight ways to be a colonizer; two ways to be an invader: a proposed nomenclature scheme for invasion ecology. *ESA Bulletin*, 81, 226-230.
43. DeWalt S.J. & Hamrick, J.L. (2004) Genetic variation of introduced Hawaiian and native Costa Rican populations of an invasive tropical shrub, *Clidemia hirta* (Melastomataceae). *American Journal of Botany* 91, 1155-1162
44. Dillon, A.K. & Stepien, C.A. (2001) Genetic and biogeographic relationships of the invasive round (*Neogobius melanostomus*) and tubenose (*Proterorhinus marmoratus*) gobies in the Great Lakes versus Eurasian populations. *Journal of Great Lakes Research*, 27, 267–280.
45. Downie, D.A. (2002) Locating the sources of an invasive pest, grape phylloxera, using a mitochondrial DNA gene genealogy. *Molecular Ecology*, 11, 2013–2026
46. 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.
47. Dronnet, S., Chapuisat, M., Vargo, E.L., Lohou, C. & Bagneres, A.G. (2005) Genetic analysis of the breeding system of an invasive subterranean termite, *Reticulitermes santonensis*, in urban and natural habitats. *Molecular Ecology*, 14, 1311–1320.
48. Dupanloup, I., Schneider, S. & Excoffier, L. (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11, 2571-2581.
49. Duthech, C., Amsellem, L., Billote, N. & Jarne, P. (2000) Characterization of (GA)n microsatellite loci using an enrichment protocol in the neotropical tree species *Vouacapoua americana*. *Molecular Ecology*, 9, 1433-1449.

50. Durka, W., Bossdorf, O., Prati, D. & Auge, H. (2005) Molecular evidence for multiple introductions of garlic mustard (*Alliaria petiolata*, Brassicaceae) to North America. *Molecular Ecology*, 14, 1697–1706.
51. Eastwood, R., Boyce, S.L., Farrell, B.D. (2006) The provenance of old world swallowtail butterflies, *Papilio demoleus* (Lepidoptera: Papilionidae), recently discovered in the new world. *Annals of the Entomological Society of America*, 99, 164–168.
52. Engelbrecht, C.J.B., Harrington, T.C., Steimel, J. & Capretti, P. (2004) Genetic variation in eastern North American and putatively introduced populations of *Ceratocystis fimbriata* f. *platani*. *Molecular Ecology*, 13, 2995–3005.
53. EPPO (2006) *Tecia solanivora*. European and Mediterranean Plant Protection Organization, Data sheets on quarantine pests http://www.eppo.org/QUARANTINE/insects/Tecia_solanivora/DSTECASO.pdf
54. Estoup, A., Beaumont, M., Sennedot, F., Moritz, C. & Cornuet, J.M. (2004) Genetic analysis of complex demographic scenarios: Spatially expanding populations of the cane toad, *Bufo marinus*. *Evolution*, 58, 2021–2036.
55. 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.
56. Evans, J.D., Pettis, J.S., Hood, W.M. & Shimanuki, H. (2003) Tracking an invasive honey bee pest: mitochondrial DNA variation in North American small hive beetles. *Apidologie*, 34, 103–109.
57. Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* 1, 47–50.

58. Facon, B., Genton, B., Shykoff, J., Jarne, P., Estoup, A. & David, P. (2006) A general eco-evolutionary framework for understanding bio- invasions. *Trends in ecology & evolution*, 21, 130-135.
59. Facon, B., Pointier, J.P., Glaubrecht, M., Poux, C., Jarne, P. & David, P. (2003) A molecular phylogeography approach to biological invasions of the New World by parthenogenetic Thiarid snails. *Molecular Ecology*, 12, 3027–3039.
60. Farias, I.P., Ortí, G., Sampaio, I., Schneider, H. & Meyer, a. (2001) The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. *Journal of molecular evolution*, 53, 89-103.
61. Fonseca, D.M., Campbell, S., Crans, W.J., Mogi, M., Miyagi, I., Toma, T., Bullians, M., Andreadis, T.G., Berry, R.L., Pagac, B., Sardelis, M.R. & Wilkerson, R.C. (2001) *Aedes* (Finlaya) *japonicus* (Diptera: Culicidae), a newly recognized mosquito in the United States: analyses of genetic variation in the United States and putative source populations. *Journal of Medical Entomology*, 38, 135–146.
62. Fournier, D., Foucaud, J., Loiseau, A., Cros-Arteil, S., Jourdan, H., Orivel, J., Le Breton, J., Chazeau, J., DeJean, A., Keller, L. & Estoup, A. (2005) Characterization and PCR multiplexing of polymorphic microsatellite loci for the invasive ant *Wasmannia auropunctata*. *Molecular Ecology Notes*, 5, 239–242.
63. Frankham, R. (2005) Invasion biology - resolving the genetic paradox in invasive species. *Heredity*, 94, 385-385.
64. Fu, Y.X. (1997) Statistical tests of neutrality against populations growth?, hitchhiking and background selection. *Genetics* 133, 693-709.
65. Gallegos, P., Suquillo, G., Chamorro, F. & Lopez, F. (1997) La palomilla de la papa *Tecia solanivora* en el Carchi, situacio y perspectives de control. *Revista INIAP*, 9, 5–6.

66. Gaskin, J.F. & Schaal, B.A. (2002) Hybrid *Tamarix* widespread in US invasion and undetected in native Asian range. *Proceedings of the Nacional Academy of Science*, 99, 11256-11259.
67. Gautschi, B., Widmer, A., Joshi, J. & Koella, J.C. (2002) Increased frequency of scale anomalies and loss of genetic variation in serially bottlenecked populations of the dice snake, *Natrix tessellata*. *Conservation Genetics*, 3, 235-245.
68. Genton, B.J., Shykoff, J.A. & Giraud, T. (2005) High genetic diversity in French invasive populations of common ragweed, *Ambrosia artemisiifolia*, as a result of multiple sources of introduction. *Molecular Ecology*, 14, 4275–4285.
69. Giraud, T., Fournier, E., Vautrin, D., Solignac, M., Vercken, E., Bakan, B. & Brygoo, Y. (2002) Isolation of eight polymorphic microsatellite loci, using an enrichment protocol, in the phytopathogenic fungus *Fusarium culmorum*. *Molecular Ecology Notes*, 2, 121–123.
70. Giron, L.F. (1984) Celebran seminario sobre la polilla de la papa. Noticia del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola, Guatemala
71. Gómez, R.d.P. (2008) Recopilacion de investigaciones sobre la polilla de la papa, *Tecia solanivora*; Lepidoptera: Gelechiidae, en quetzaltenango, Guatemala. Universidad San Carlos de Guatemala. p3
72. Golani, D., Azzurro, E., Corsini-Foka, M., Falautano, M., Andaloro, F. & Bernardi, G. (2007) Genetic bottlenecks and successful biological invasions: the case of a recent Lessepsian migrant. *Biology Letters*, 3, 541-545.
73. Gomez de Paz, R. (2008) Recopilacion de investigaciones sobre la polilla de la papa *Tecia Solanivora*, Lepidoptera: Gelechiidae, en Quetzaltenango, Guatemala. Dissertation, Universidad de San Carlos de Guatemala.

74. Grapputo, A., Boman, S., Lindstrom, L., Lyytinen, A. & Mappes, J. (2005) The voyage of an invasive species across continents: genetic diversity of North American and European Colorado potato beetle populations. *Molecular Ecology*, 14, 4207–4219.
75. Green, R.E. (1997) The influence of numbers released on the outcome of attempts to introduce exotic bird species to New Zealand. *Journal of Animal Ecology*, 66, 25–35.
76. Hagelberg, E., Goldman, N., Lio, P., Whelan, S., Schiefenhover, W., Clegg, J.B. & Bowden, D.K. (1999) Evidence for mitochondrial DNA recombination in a human population of island Melanesia. *Proceedings of the royal society of London series B-Biological sciences*, 266, 485–492.
77. Hänfling, B., Carvahlo, G.R. & Brandl, R. (2002) mt-DNA sequences and possible invasion pathways of the Chinese mitten crab. *Marine Ecology Progress Series*, 238, 307–310.
78. Hänfling, B. & Kollmann, J. (2002) An evolutionary perspective of biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, 17, 545–546.
79. Hannan-Jones, M.A., Lowe, A.J., Scott, K.D., Graham, G.C., Playford, J.P. & Zalucki, M.P. (2005) Isolation and characterization of microsatellite loci from mother-of-millions, *Bryophyllum delagoense* (Crassulaceae), and its hybrid with *Bryophyllum daigremontianum*, ‘Houghton’s hybrid’. *Molecular Ecology Notes*, 5, 770–773.
80. Harry, M., Solignac, M. & Lachaise, D. (1998) Molecular evidence for parallel evolution and adaptive syndromes in figbreeding *Lissocephala* (Drosophilidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 9, 542–551.
81. Hassan, M., Harmelin-Vivien, M. & Bonhomme, F. (2003) Lessepsian invasion without bottleneck: example of two rabbitfish species (*Siganus rivulatus* and *Siganus luridus*). *Journal of experimental Marine Biology and Ecology*, 291, 219–232.

82. Hawley, D., Briggs, J., Dhondt, A. & Lovette, I. (2008) Reconciling molecular signatures across markers: mitochondrial DNA confirms founder effect in invasive North American house finches (*Carpodacus mexicanus*). *Conservation Genetics*, 9, 637-643.
83. Hawley, D.M., Hanley, D., Dhondt, A.A. & Lovette, I.J. (2006) Molecular evidence for a founder effect in invasive house finch (*Carpodacus mexicanus*) populations experiencing an emergent disease epidemic. *Molecular Ecology*, 15, 263–275.
84. Hernandez-Lopez, N. (2007) Variacion morfologica asociada a la distribucion agro-ecologica de la polilla guatemalteca de la papa, *Tecia solanivora* (Povolny), en dos provincias de Ecuador. Disertacion previa a la obtencion del titulo de Licenciada en Ciencias Biologicas. Pontificia Universidad Catolica del Ecuador.
85. Hickey, A.J.R., Lavery, S.D., Eyton, S.R. & Clements, K.D. (2004) Verifying invasive marine fish species using molecular techniques: a model example using triplefin fishes (Family Tripterygiidae). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 38, 439–446.
86. Hijmans, R.J. and Spooner, D.M. (2001) Geographic distribution of wild potato species. *American Journal of Botany*, 88, 2101-2112.
87. Holland, B.S. (2001) Invasion without a bottleneck: microsatellite variation in natural and invasive populations of the brown mussel *Perna perna*. *Marine Biotechnology*, 3, 407–415.
88. ICTA (1977) El cultivo de la papa en Guatemala. Folleto técnico Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola no. 6. Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas, Sector Publico Agropecuario y de Alimentación, Guatemala.

89. Jermini, L. & Crozier, R. (1994) The cytochrome b region in the mitochondrial DNA of the ant *Tetraponera rufoniger*: sequence divergence in Hymenoptera may be associated with nucleotide content. *Journal of Molecular Evolution*, 38, 282–294.
90. Ji, Y.J., Zhang, D.X., Hewitt, G.M., Kang, L. & Li, D.M. (2003) Polymorphic microsatellite loci for the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae) and some remarks on their isolation. *Molecular Ecology Notes*, 3, 102–104.
91. Johnson, R.N. & Starks, P.T. (2004) A surprising level of genetic diversity in an invasive wasp: *Polistes Dominulus* in the Northeastern United States. *Annals of the Entomological Society of America*, 97, 732–737.
92. Jousson, O., Pawlowski, J., Zaninetti, L., Zechman, F.W., Dini, F., Di Guiseppe, G., Woodfield, R., Millar, A. & Meinesz, A. (2000) Invasive alga reaches California. *Nature*, 408, 157–158.
93. Kawamura, K., Yonekura, R., Katano, O., Taniguchi, Y. & Saitoh, K. (2006) Origin and dispersal of bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*, in Japan and Korea. *Molecular Ecology*, 15, 613–621.
94. King, A.B.S. & Saunders, J.L. (eds) (1984) The invertebrate pests of annual food crops in Central America. *Overseas Development Administration*, London.
95. Kliber, A. & Eckert, C.G. (2005) Interaction between founder effect and selection during biological invasion in an aquatic plant. *Evolution*, 59, 1900–1913.
96. Kochzius, M. & Nuryanto, A. (2008) Strong genetic population structure in the boring giant clam, *Tridacna crocea*, across the Indo-Malay Archipelago: implications related to evolutionary processes and connectivity. *Molecular Ecology*, 17, 3775–3787.
97. Kolar, C.S. & Lodge, D.M. (2001) Progress in invasion biology: predicting invaders. *Trends in Ecology & Evolution*, 16, 199–204.

98. Kolbe, J.J., Glor, R.E., Schettino, L.R.G., Lara, A.C., Larson, A. & Losos, J.B. (2004) Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. *Nature*, 431, 177-181.
99. Kroschel, J. (2008) CIP's global potato agroecology IPM program. CIP's Annual Meeting, October 2008.
100. Laffin, R.D., Dosdall, L.M. & Sperling, F.A.H. (2005) Population structure of the cabbage seedpod weevil, *Ceutorhynchus obstricus* (Marsham) (Coleoptera Curculionidae): origins of North American introductions. *Environmental Entomology*, 34, 504–510.
101. Langella (2002) POPULATIONS.
http://www.bioinformatics.org/project/?group_id=84
102. Le Corre, V. & Kremer, A. (1998) Cumulative effects of founding events during colonisation on genetic diversity and differentiation in an island and stepping-stone model. *Journal of Evolutionary Biology*, 11, 495-512.
103. Le Page, S.L., Livermore, R.A., Cooper, D.W. & Taylor, A.C. (2000) Genetic analysis of a documented population bottleneck: introduced Bennett's wallabies (*Macropus rufogriseus rufogriseus*) in New Zealand. *Molecular Ecology*, 9, 753–763.
104. Leal, H. & Raman, K. (1989) *Scrobipalpoipsis solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) en Centroamérica. Dissertation, Guatemala
105. Leberg, P.L. (1992) Effects of population bottlenecks on genetic diversity as measured by allozyme electrophoresis. *Evolution*, 47, 477-494.
106. Lee, C. (2002) Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology & Evolution*, 17, 386-391.

107. Le Roux, J.J., Wieczorek, A.M. & Meyer, J.Y. (2008) Genetic diversity and structure of the invasive tree *Miconia Calvescens* in pacific Islands. *Diversity and Distribution* 14, 935-948.
108. Lindholm, A.K., Breden, F., Alexander, H.J., Chan, W.K., Thakurta, S.G. & Brooks, R. (2005) Invasion success and genetic diversity of introduced populations of guppies *Poecilia reticulata* in Australia. *Molecular Ecology*, 14, 3671–3682.
109. Lonsdale, W.M. (1994) Inviting trouble: introduce pasture species in northern Australia. *Aust. J. Ecol.*, 19, 345-354.
110. Luikart, G. & Cornuet, J.M. (1998) Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology*, 12, 228-237.
111. Mack, R.N., Simberloff, D., Lonsdale, W.M., Evans, H., Clout, M. & Bazzaz, F.A. (2000) Biotic invasions: Causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecological Applications*, 10, 689-710
112. Maddison, D.R. & Maddison, W.P. (2000) MacClade: analysis of phylogeny and character evolution 4.06. Sinauer Associates, Sunderland, MA
113. Martel, C., Viard, F., Bourguet, D. & Garcia-Meunier, P. (2004) Invasion by the marine gastropod *Ocenebrellus inornatus* in France: I. Scenario for the source of introduction. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 305, 155–170.
114. McCauley, D.E., Smith, R.A., Lisenby, J.D. & Hsieh, C. (2003) The hierarchical spatial distribution of chloroplast DNA polymorphism across the introduced range of *Silene vulgaris*. *Molecular Ecology*, 12, 3227–3235.
115. Meffert, L.M. & Bryant, E.H. (1992) Divergent ambulatory and grooming behavior in serially bottlenecked lines of the housefly. *Evolution*, 46, 1399-1407.

116. Meglecz, E., Petenian, F., Danchin, E., Coeur d'Acier, A., Rasplus, J.Y. & Faure, E. (2004) High similarity between flanking regions of different microsatellites detected within each of two species of Lepidoptera: *Parnassius apollo* and *Euphydryas aurinia*. *Molecular Ecology*, 13, 1693-1700.
117. Meglecz, E., Anderson, S.J., Bourguet, D., Butcher, R., Caldas, A., Cassel-Lundhagen, A., Coeur d'Acier, A., Dawson, D.A., Faure, N., Fauvelot, C., Franck, P., Harper, G., Keyghobadi, N., Kluetsch, C., Muthulakshmi, M., Nagaraju, J., Patt, A., Petenian, F., Silvain, J-F. & Wilcock, H.R. (2007) Microsatellite flanking region similarities among different loci within insect species. *Insect Molecular Biology*, 16, 175-185.
118. Meglecz, E. & Solignac, M. (1998) Microsatellite loci for *Parnassius mnemosyne* (Lepidoptera). *Hereditas*, 128, 179-180.
119. Meyer, A. (1994) Shortcomings of the cytochrome b genes as molecular marker. *Trends in Ecology & Evolution*, 9, 278-280.
120. Meunier, C., Tirard, C., Hurtrez-Bousses, S., Durand, P., Bargues, M.D., Mas-Coma, S., Pointier, J.P., Jourdane, J. & Renaud, F. (2001) Lack of molluscan host diversity and the transmission of an emerging parasitic disease in Bolivia. *Molecular Ecology*, 10, 1333-1340.
121. Money, H.A. & Cleland, E.E. (2001) The evolutionary impact of invasive species. *Proceedings of the National Academy of Science*, 98, 5446-5451.
122. Moyer, G.R., Osborne, M. & Turner, T.F. (2005) Genetic and ecological dynamics of species replacement in an arid-land river system. *Molecular Ecology*, 14, 1263-1273.

123. Murillo, R. (1980) Memoria del primer seminario internacional sobre polillas de la papa *Scrobipalposis solavivora* Povolny y *Phthorimaea operculella* Zeller. Ministerio de Agricultura y Ganaderia. Costa Rica pp10-11
124. Murillo Ruth (1982) Memoria segundo seminario regional sobre investigación y combate de las polillas de la papa *Scrobipalposis solavivora* Povolny y *Phthorimaea operculella* Zeller. Ministerio de Agricultura y Ganaderia (PRECODEPA). Costa Rica pp10-11
125. Nardi, F., Carapelli, A., Dallai, R., Roderick, G.K. & Frati, F. (2005) Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). *Molecular Ecology*, 14, 2729–2738.
126. Navia, D., de Moraes, G.J., Roderick, G. & Navajas, M. (2005) The invasive coconut mite *Aceria guerreronis* (Acari: Eriophyidae): origin and invasion sources inferred from mitochondrial (16S) and nuclear (ITS) sequences. *Bulletin of Entomological Research*, 95, 505–516.
127. Nei, M. (1987) Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New-york.
128. Nei, M., Maruyama, T. & Chakraborty, R. (1975) The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, 29, 1–10.
129. Neilson, M.E. & Wilson, R.R. (2005) mtDNA singletons as evidence of a post-invasion genetic bottleneck in yellowfin goby *Acanthogobius flavimanus* from San Francisco Bay, California. *Marine Ecology Progress Series*, 296, 197–208.
130. Nève, G. & Megléc, E. (2000) Microsatellite frequencies in different taxa. *Trends in Ecology & Evolution*, 15, 376–377.
131. Niño L. (2004) Revision sobre la Polilla de la papa *Tecia solanivora* en Centro y Sur America. Suplemento Revista latinoamericana de la papa. 4-21

132. Noor, M.A.F., Pascual, M. & Smith, K.R. (2000) Genetic variation in the spread of *Drosophila subobscura* from a nonequilibrium population. *Evolution*, 54, 696–703.
133. Notz, A. (1996) Influencia de la temperatura sobre la biología de *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae) criadas en tubérculos de papa *Solanum tuberosum*. *Boletín Entomológico de Venezuela*, 11, 49–54 ;
134. Novak, S.J. & Mack, R.N. (2005) Genetic bottlenecks in alien plant species: influences of mating systems and introduction dynamics. In: Sax, D.F., Stachowicz, J.J., Gaines, S.D. (eds) *Species invasions: insights into ecology, evolution, and biogeography*. Sinauer, Sunderland
135. Onyabe, D.Y. & Conn, J.E. (2001) Population genetic structure of the malaria mosquito *Anopheles arabiensis* across Nigeria suggests range expansion. *Molecular Ecology*, 10, 2577-2591.
136. Palumbi, S.R., Martin, A., Romano, S., McMillan, W.O. & Grabowski, G. (1991) *The simple fool's guide to PCR, Version 2.0*. Kewalo Marine Laboratory and Univ. of Hawaii, Manoa
137. Pascual, M., Chapuis, M.P., Mestres, F., Balanya, J., Huey, R.B., Gilchrist, G.W., Serra, L. & Estoup, A. (2007) Introduction history of *Drosophila subobscura* in the New World: a microsatellite-based survey using ABC methods. *Molecular Ecology*, 16, 3069-3083.
138. Peakall, R. & Smouse, P.E. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288-295.
139. Pedersen, J.S., Krieger, M.J.B., Vogel, V., Giraud, T. & Keller, L. (2006) Native supercolonies of unrelated individuals in the invasive Argentine ant. *Evolution* 60, 782-791.

140. Pejchar, L. & Mooney, H. (2009) Invasive species, ecosystem services and human well-being. *Trends in Ecology & Evolution*, 24, 497–504.
141. Perez, J.E., Nirchio, M., Alfonsi, C. & Munoz, C. (2006) The biology of invasions: the genetic adaptation paradox. *Biological Invasions*, 8, 1115–1121.
142. Petit, R.J., Bialozyt, R., Garnier-Gere, P. & Hampe A. (2004) Ecology and genetics of tree invasions: from recent introductions to Quaternary migrations. *Forest Ecology and Management*, 197, 117-137.
143. Pimentel, D., Lach, L., Zuniga, R. & Morrison, D. (2000) Environmental and economic costs of nonindigenous species in the United States. *Bioscience*, 50, 53-65.
144. Pinceel, J., Jordaens, K., Houtte, N., Bernon, G. & Backeljau, T. (2005) Population genetics and identity of an introduced terrestrial slug: *Arion subfuscus* s.l. in the North-east USA (Gastropoda, Pulmonata, Arionidae). *Genetica* 125, 155–171.
145. Piry, S., Luikart, G. & Cornuet, J.M. (1999) BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, 90, 502-503.
146. Pollet, A., Barragan, A., Lagnaoui, A., Prado, M., Onore, G., Aveiga, I., Lery, X. & Zeddami, J-L. (2003) Prediccions de la polilla guatemalteca *Tecia solanivora* (Povolny) 1973 (Lepidoptera : Gelechiidae) en el Ecuador. *Plagas*, 29, 233–242.
147. Poulin, J., Weller, S.G. & Sakai, A.K. (2005) Genetic diversity does not affect the invasiveness of fountain grass (*Pennisetum setaceum*) in Arizona, California and Hawaii. *Diversity and Distributions*, 11, 241–247.
148. Povolny, D. (1973) *Scrobipalopsis solanivora* sp. n.-A new pest of potato (*Solanum tuberosum*) from Central America. *Acta Universitatis Agriculturae, Facultas Agronomica*, 21, 143-146.

149. Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945-959.
150. Provan, J.I.M., Murphy, S. & Maggs, C.A. (2005) Tracking the invasive history of the green alga *Codium fragile* ssp. *tomentosoides*. *Molecular Ecology*, 14, 189–194.
151. Pruett, C.L. & Winker, K. (2005) Northwestern song sparrow populations show genetic effects of sequential colonization. *Molecular Ecology*, 14, 1421-1434.
152. Puillandre, N., Dupas, S., Dangles, O., Zeddami, J., Capdevielle-Dulac, C., Barbin, K., Torres-Leguizamon, M. & Silvain, J. (2007) Genetic bottleneck in invasive species: the potato tuber moth adds to the list. *Biological Invasions*, 10, 319-333.
153. Pysek, P. & Richardson, D.M. (2006) The biogeography of naturalization in alien plants. *Journal of Biogeography*, 33, 2040-2050.
154. R Development Core Team (2004) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria
155. Ramos-Onsins, S.E. Rozas, J. (2002) Statistical properties of new neutrality test against populations growth. *Molecular Biology and Evolution* 19, 2092-2100.
156. Raymond, M. & Rousset, F. (1995) genepop (version 1.2): population genetics software for exact test and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86, 248–249.
157. Reed, D.H. & Frankham, R. (2001) How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? *Evolution*, 55, 1095–1103.
158. Reed, D.H. & Frankham, R. (2003) Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology*, 17, 230–237.
159. Rejmanek M. (2002) Intraspecific aggregation and species coexistence. *Trends in Ecology & Evolution*, 17, 209-210.

160. Richardson, D.M., Pysek, P., Rejmanek, M., Barbour, M.G., Panetta, F.D. & West, C.J. (2000) Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity and Distributions*, 6, 93-107.
161. Rincon, F. & Lopez-Avila, A. (2004) Dimorfismo sexual en pupas de *Tecia solanivora*. *Revista Corpoica*, 5, 41-42.
162. Roderick, G.K. & Navajas, M. (2003) Genes in new environments: Genetics and evolution in biological control. *Nature reviews genetics*, 4, 889-899.
163. Rollins, L., Woolnough, A., Wilton, A., Sinclair, R. & Sherwin, W. (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.
164. Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X. & Rozas, R. (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19, 2496-2497.
165. Rozen, S. & Skaletsky, H.J. (1998) Primer 3. Available from http://WWWgenome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html
166. Rozen, S. & Skaletsky, H.J. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, 365-386. Available from <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>
167. Rychlik, W. (2000) OLIGO: primer analysis software. Molecular Biology Insights, West Cascade, CO, USA.
168. Ruano, S., Leal, H., Del cid, A. & Rios, E. (1984) Generalidades sobre el cultivo de la papa y los efectos causados por polilla en tres areas de Quetzaltenango. Programa

- Regional Cooperativo de papa PRECODEPA Instituto de ciencia y Tecnología Agrícola. Guatemala
169. Saccone, C., Pesole, G. And Sbisa, E. (1991) The main regulatory region of mammalian mitochondrial-DNA - structure-function model and evolutionary pattern. *Journal of Molecular Evolution*, 31, 83-91.
 170. Sakai, A.N., Allendorf, F.W., Holt, J.S., Lodge, D.M., Molofsky, J. & With, K.A. (2001) The population biology of invasive species. *Annual Review of Entomology*, 32, 305-332.
 171. Salazar, J. & Escalante, W. (1984) La polilla guatemalteca de la papa, *Scrobipalopsis solanivora*, nueva plaga del cultivo de la papa en Venezuela. *Jornadas Agronómicas*, 9, 24-28.
 172. Sax, D., Stachowicz, J., Brown, J., Bruno, J., Dawson, M., Gaines, S., Grosberg, R., Hastings, A., Holt, R., Mayfield, M. & others. (2007) Ecological and evolutionary insights from species invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, 22, 465–471.
 173. Shea, K. & Chesson, P. (2002) Community ecology theory as a framework for biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, 17, 170–176.
 174. Scheffer, S.J. & Grissell, E.E. (2003) Tracing the geographical origin of *Megastigmus transvaalensis* (Hymenoptera: Torymidae): an African wasp feeding on a South American plant in North America. *Molecular Ecology*, 12, 415–421.
 175. Scheffer, S.J., Lewis, M.L. (2005) Mitochondrial phylogeography of vegetable pest *Liriomyza Sativae* (Diptera: Agromyzi- dae): divergent clades and invasive populations. *Annals of the Entomological Society of America*, 98, 181–186.
 176. Shefer, S., Abelson, A., Mokady, O. & Geffen, E. (2004) Red to Mediterranean Sea bioinvasion: natural drift through the Suez Canal, or anthropogenic transport? *Molecular Ecology*, 13, 2333– 2343.

177. Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. & Flook, P. (1994) Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved PCR primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87, 651–701.
178. Simon-Bouhet, B., Garcia-Meunier, P. & Viard, F. (2006) Multiple introductions promote range expansion of the mollusc *Cyclope nerritea* (Nassariidae) in France: evidence from mitochondrial sequence data. *Molecular Ecology*, 15, 1699–1711.
179. Stadler, T., Frye, M., Neiman, M. & Lively, C.M. (2005) Mitochondrial haplotypes and the New Zealand origin of clonal European *Potamopyrgus*, an invasive aquatic snail. *Molecular Ecology*, 14, 2465–2473.
180. Steiner, F.M., Schlick-Steiner, B.C., Trager, J.C., Moder, K., Sanetra, M., Christian, E. & Stauffer, C. (2006) *Tetramorium tsushimae*, a new invasive ant in North America. *Biological Invasions*, 8, 117–123.
181. Stepien, C.A., Dillon, A.K. & Chandler, M.D. (1998) Genetic identity, phylogeography, and systematics of ruffe *Gymnocephalus* in the North American Great Lakes and Eurasia. *Journal of Great Lakes Research*, 24, 361–378.
182. Stepien, C.A. & Tumeo, M.A. (2006) Invasion genetics of Ponto Caspian gobies in the Great Lakes: a ‘Cryptic’ species, absence of founder effects, and comparative risk analysis. *Biological Invasions*, 18, 61–78.
183. Tajima, F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585–595
184. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596–1599.

185. Taylor, A.C., Cowan, P.E., Fricke, B.L., Geddes, S., Hansen, B.D., Lam, M. & Cooper, D.W. (2004) High microsatellite diversity and differential structuring among populations of the introduced common brushtail possum, *Trichosurus vulpecula*, in New Zealand. *Genetical Research*, 83, 101–111.
186. Templeton, A.R., Crandall, K.A. & Sing, C.F. (1992) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetic*, 132, 619–633
187. Therriault, T.W., Orlova, M.I., Docker, M.F., MacIsaac, H.J. & Heath, D.D. (2005) Invasion genetics of a freshwater mussel (*Dreissena rostriformis bugensis*) in eastern Europe: high gene flow and multiple introductions. *Heredity*, 95, 16–23.
188. Thompson, K., Hodgson, J.G. & Rich, T.C.G. (1995) Native and alien invasive plants: More of the same? *Ecogeography*, 18, 390–402.
189. Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994) clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673–4680.
190. Torres, F. (1989) Algunos aspectos de la biología y comportamiento de la polilla de la papa *Scrobipalopsis solanivora* Povolny 1973 (Lepidoptera: Gelechiidae) en el estado Táchira, Venezuela. Tesis de Magíster Sc. Universidad Central de Venezuela. p86.
191. Torres, F. (2003) Polilla de la papa *Tecia solanivora* (Povolny). Plagas agrícolas de Venezuela, Ficha técnicas de organismos plaga, Cultivo: Papa. *Solanum tuberosum*. Sociedad Venezolana de Entomología. http://www.plagas-agricolas.info.ve/fichas/cultivo_x_plaga.php?plaga=175

192. Torres. F., Notz, A. & Valencia, L. (1997) Ciclo de vida y otros aspectos de la biología de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae) en el estado Tachira, Venezuela. *Boletín Entomológico de Venezuela*, 12, 81–94.
193. Tsutsui, N.D., Suarez, A.V., Holway, D.A. & Case, T.J. (2001) Relationships among native and introduced populations of the Argentine ant (*Linepithema humile*) and the source of introduced populations. *Molecular Ecology*, 10, 2151–2161.
194. Turon, X., Tarjuelo, I., Duran, S. & Pascual, M. (2003) Characterizing invasion processes with genetic data: an Atlantic clade of *Clavelina lepadiformis* (Ascidacea) introduced into Mediterranean harbours. *Hydrobiologia*, 503, 29–35.
195. van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M. & Shipley, P. (2004) micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535–538.
196. Waldman, J.R. (2004) Mitochondrial DNA analysis indicates sea lampreys are indigenous to Lake Ontario. *Transactions of the American Fisheries Society*, 133, 950–960.
197. Wang, C., Li, S., Fu, C., Gong, X., Huang, L., Song, X. & Zhao, Y. (2009) Molecular genetic structure and evolution in native and colonized populations of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Biological invasions*, 11, 389–399.
198. Wares JP, Hughes AR, RK G (2005) Mechanisms that drive evolutionary change: insights from species introductions and invasions. In: *Species Invasions: Insights into Ecology, Evolution and Biogeography* (eds Sax DF, Stachowicz JJ, Gaines SD), pp. 229–257. Sinauer & Associates Inc, Sunderland, Massachusetts.

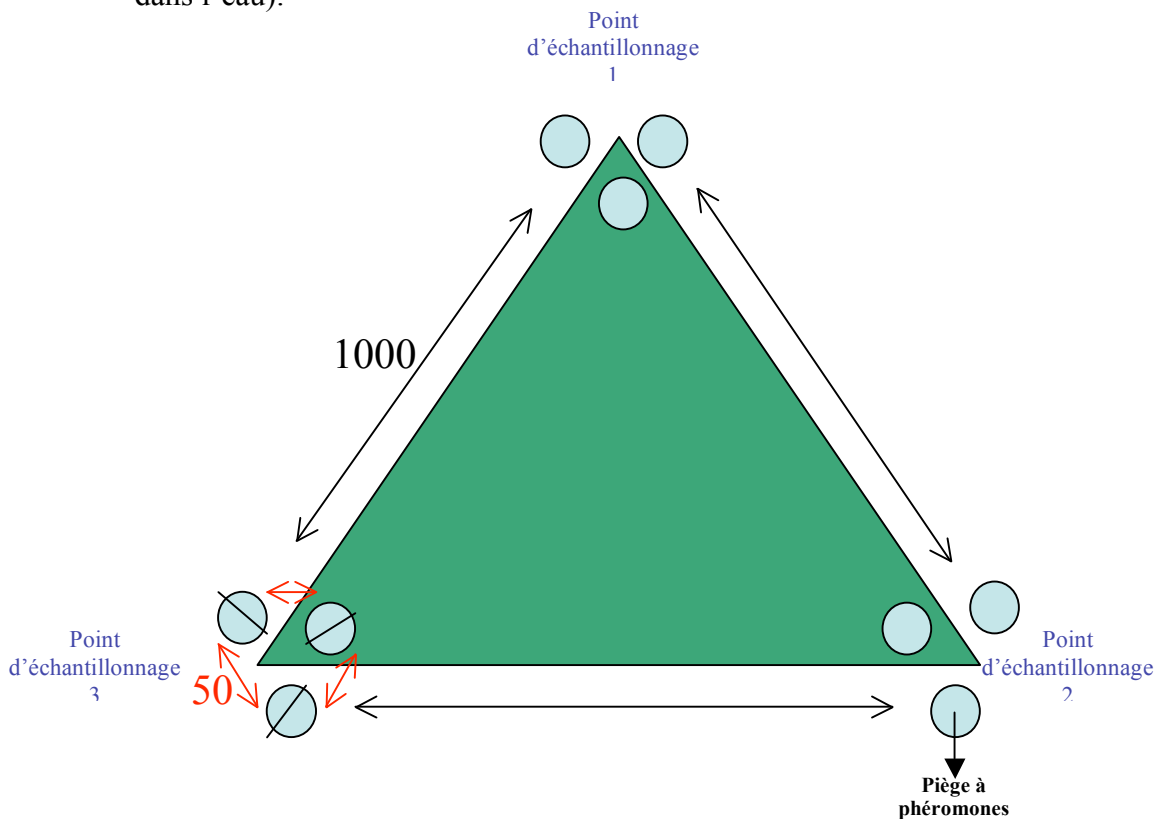
199. Williams, D.A., Overholt, W.A., Cuda, J.P. & Hughes, C.R. (2005) Chloroplast and microsatellite DNA diversities reveal the introduction history of Brazilian peppertree (*Schinus terebinthifolius*) in Florida. *Molecular Ecology*, 14, 3643–3656.
200. Williamson, M. & Fitter, A. (1996) The varying success of invaders. *Ecology*, 77, 1661-1666.
201. Williamson M (1996) Biological Invasions. Chapman & Hall, London.
202. Zardus, J.D. & Hadfield, M.G. (2005) Multiple origins and incursions of the Atlantic barnacle *Chthamalus proteus* in the Pacific. *Molecular Ecology* 14, 3719–3733.
203. Zhang, D.X. (2004) Lepidopteran microsatellite DNA: redundant but promising. *Trends in Ecology & Evolution*, 19, 507-509.
204. Zhang, B.C. (1994) Index of economically important Lepidoptera. CAB International, UK.

Annexe

Annexe n°1

Protocole pour l'échantillonnage d'individus adultes de *Tecia solanivora*

1. Placer trois points d'échantillonnages à 1 000m les uns des autres. Placer les trois points d'échantillonnages aux sommets d'un triangle équilatéral.
2. Pour chaque point d'échantillonnage, tracer de nouveau un triangle et y placer trois pièges à phéromones séparés de 50 m les uns des autres. (Ajouter un peu de savon dans l'eau).



Les trois points d'échantillonnage devront être placés loin de toutes zones de stockage de pomme de terre.

Si possible, les pièges à phéromones devront être orientés dans des directions différentes.

3. Laisser les pièges sur place entre 1 jour et une semaine puis récolter les individus piégés (morts ou vifs).
4. Pour chaque piège, récolter tous les individus et les placer dans des tubes d'analyses contenant de l'éthanol à 75%.

LE PLUS IMPORTANT DANS L'ECHANTILLONNAGE EST DE NE SURTOUT PAS MELANGER LES INDIVIDUS PIEGES DANS DES PIEGES DIFFERENTS. UTILISER UN TUBE D'ANALYSE POUR CHAQUE PIEGE.

A la fin de l'échantillonnage, vous devrez avoir 9 tubes correspondant aux 9 pièges.

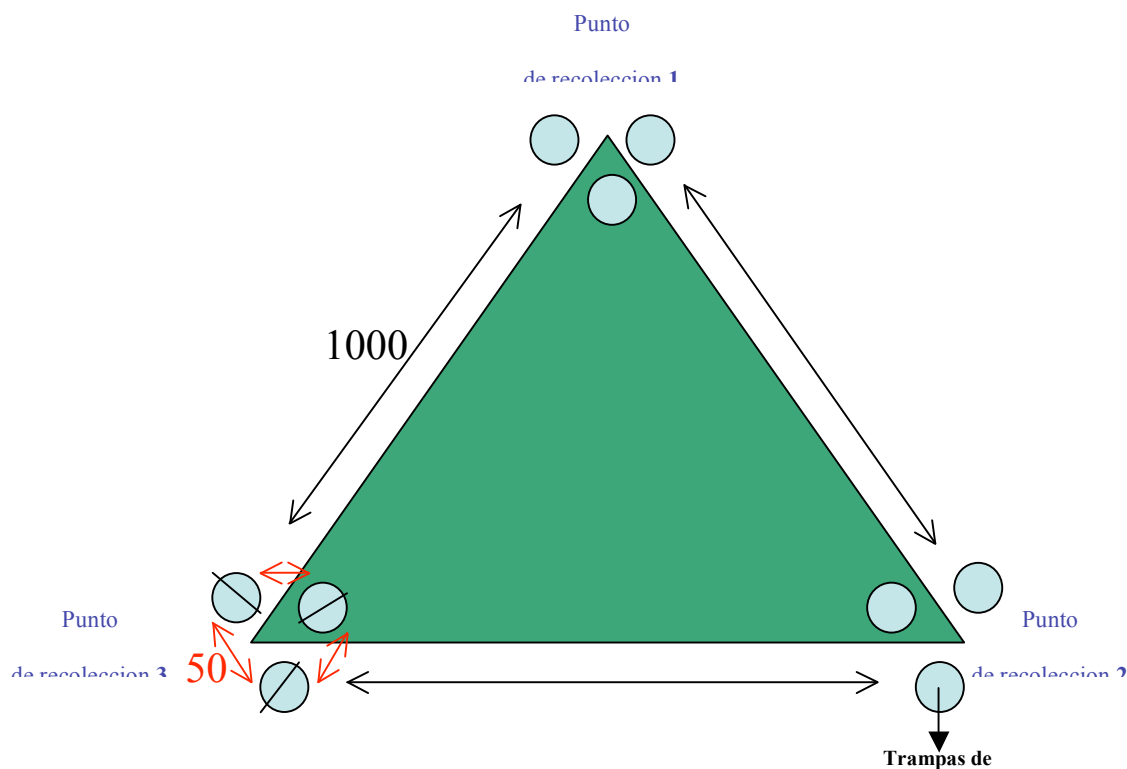
5. Pour chaque point d'échantillonnage, merci de remplir la fiche technique suivante :

Points d'échantillonnage 1.

Lieu d'échantillonnage	
Coordonnées géographique (GPS)	
Altitude	
Température moyenne	
Précipitation moyenne	
Type de végétation aux alentours de la zone échantillonnée.	

Protocolo para la recolección de individuos adultos de *Tecia solanivora*.

1. Ubicar tres puntos de recolección equidistantes de 1000m entre ellos. Tratar de ubicarlos dentro de un área que haga un triángulo isósceles.
2. En cada punto de recolección trazar de nuevo un triángulo, ubicando 3 trampas de feromonas separadas entre ellas 50m. (agregar jabón al agua).



Los tres puntos de recolección deben encontrarse lejos de cualquier lugar en donde se almacene la papa.

De ser posible las trampas de feromonas deben ser orientadas en direcciones diferentes.

3. Dejar las trampas de 1 día a una semana, recolectar los individuos que cayeron en la trampa (tomar individuos vivos y muertos).
4. Por cada trampa recolectar todos los individuos que caigan en un frasco pequeño que contenga alcohol al 75%.

LO MAS IMPORTANTE DEL MUESTREO ES NO MEZCLAR LOS INDIVIDUOS QUE HAYAN CAIDO EN TRAMPAS DIFERENTES. UTILIZAR UN FRASCO POR CADA TRAMPA COLOCADA.

Al final del muestreo se tendrán 9 tubos (1 por cada trampa colocada).

5. Por cada punto de recolección llenar la siguiente ficha técnica:

Punto de recolección 1.

Lugar de recolección	
Coordenadas geográficas (GPS)	
Altitud	
Temperatura promedio	
Precipitación promedio	
Tipo de vegetación alrededor del área muestreada	