



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie

Ecole doctorale (VAS)

présentée par

Mohannad Ahmad Ismail

Equipe d'accueil : UMR 6553 ECOBIO écosystèmes - Biodiversité - Evolution
Equipe PYSACLIM Paysages - Changements climatiques - Biodiversité
Composante universitaire : UFR Science de la vie et de l'Environnement

**Plasticité de la réponse à
l'exposition au froid chez
Aphidius ervi dans le
cadre des processus de
stockage utilisés en lutte
biologique**

**Thèse soutenue à Rennes le 11 février
2011**

devant le jury composé de :

Jacques Brodeur

Pr. Université de Montréal / *rapporteur*

Jean-Claude Grégoire

Pr. Université libre de Bruxelles / *rapporteur*

Guy Boivin

Agriculture et Agroalimentaire Canada / *examineur*

Jean-Sébastien Pierre

Pr. Université de Rennes1 / *examineur*

Hervé Colinet

UCL, Belgique / *examineur*

Joan van Baaren

MC. Université de Rennes1 / *directrice de thèse*

Philippe Vernon

Dr. Université de Rennes1 / *co-directeur de thèse*

Thierry Hance

Pr. UCL, Belgique / *co-directeur de thèse*

Financial support

This thesis was supported by a scholarship from the Syrian Ministry of Higher Education, and funded by the UMR 6553 CNRS Ecobio at the University of Rennes 1 and by the Biodiversity Research Centre at the Catholic University of Louvain. The participation in scientific conferences was funded by the UMR-CNRS 6553 EcoBio and by the region of Brittany.

Sommaire

Remerciements	
Chapitre 1 : Introduction	1
1. Présentation et définition de la lutte biologique	2
1.1. Définition	2
1.2. Les différentes méthodes de lutte biologique	2
1.2.1. La lutte biologique classique ou lutte biologique par acclimatation	2
1.2.2. La lutte biologique par conservation	3
1.2.3. Le renforcement des populations d'ennemis naturels par lâchers inondatifs	4
2. Le stockage au froid	5
2.1. Impact des températures froides sur les ectothermes en conditions naturelles	6
2.2. Les stratégies de résistance aux basses températures (résistance à la congélation) chez les insectes	7
2.3. Impacts négatifs du stockage au froid	9
2.4. Comment limiter les effets négatifs du stockage au froid	10
2.4.1. Le choix du stade et de l'âge au sein d'un stade	10
2.4.2. Impact de la photopériode	12
2.4.3. Impact de la diapause ou de la quiescence	12
2.4.4. Impact de l'acclimatation	13
2.4.5. Impact des régimes de températures fluctuantes	14
2.5. Les coûts physiologiques et la sélection	15
3. Qu'est-ce que la « qualité » chez les parasitoïdes?	15
3.1. Qualité et fitness	16
3.2. Les réserves lipidiques	17
3.3. Le taux métabolique	18
3.4. Les paramètres de la croissance démographique	19
4. Objectifs de la thèse.....	21
Chapitre 2 : Modèle d'étude.....	23
1. Les parasitoïdes	24
2. Les espèces étudiées.....	25
2.1. L'hôte	25
2.1.1. Données biologiques	25

2.1.2. Elevage	28
2.2. Les parasitoïdes du genre <i>Aphidius</i>	29
2.2.1. Introduction.....	29
2.2. 2. Le cycle biologique	29
2.2.3. Les effets du stockage au froid chez <i>Aphidius</i>	31
2.3. <i>Aphidius ervi</i>	31
2.3.1. La distribution géographique	31
2.3.2. La morphologie	31
2.3.3. Le spectre d'hôtes.....	31
2.3.4. Elevage	32
Chapitre 3 : Article1	35
Mohannad Ismail, Philippe Vernon, Thierry Hance, Joan van Baaren. 2010. Physiological Costs of Cold Exposure on the Parasitoid <i>Aphidius ervi</i> , without selection pressure and under constant or fluctuating temperatures.	
Chapitre 4 : Article2	65
Mohannad Ismail, Philippe Vernon, Thierry Hance, Jean-Sebastien Pierre, Joan van Baaren Thermal stress resistance, size and fitness in energetically constrained ectotherms: is smaller better?	
Chapitre 5 : Article3	91
Mohannad Ismail, Joan van Baaren, Jean-Sebastien Pierre, Philippe Vernon, Thierry Hance The effect of cold storage on the growth rate of the population of <i>Aphidius ervi</i> (Hymenoptera: Braconidae)	
Chapitre 6 : Article4	117
Mohannad Ismail, Joan van Baaren, Thierry Hance, Jean-Sebastien Pierre, Philippe Vernon Stress intensity and fitness: low temperature combined with fluctuating regime is a must.	
Discussion générale.....	139
Perspectives.....	151
References bibliographiques	153

Liste des figures

- Figure 1.** Courbe de performance d'un organisme ectotherme en fonction de la température corporelle (d'après Huey & Kingsolver, 1989). Min TC = Minimum thermique critique, Max TC : Maximum thermique critique..... 7
- Figure 2.** Une plante affectée par le puceron *S. avenae* 25
- Figure 3.** Cycle biologique du puceron des épis *S. avenae*. Ce schéma regroupe les cycles d'holocyclie (—>) et d'anholocyclie (····>) qui peuvent être observés chez ce puceron (Adapté de Outreman, 2000)..... 27
- Figure 4.** Des cages en plexiglas contenant de pots de blé infestés par des pucerons *S. avenae* 28
- Figure 5.** Cycle de vie d'un parasitoïde du genre *Aphidius* (adapté de Outreman, 2000 ; les photos des larves proviennent de la publication de Muratori *et al.*, 2004 ; la photo d'accouplement a été réalisée par Sonia Dourlot)..... 30

Liste des tableaux

Tableau 1. Stade de développement choisi chez les insectes prédateurs et parasitoïdes pour le stockage au froid	11
Tableau 2. Les conséquences négatives du stockage au froid chez différentes espèces de parasitoïdes du genre <i>Aphidius</i>	33

Remerciements

J'exprime mes profonds remerciements à mes directeurs de thèse : Joan van Baaren, maître de conférence à l'université de Rennes1 ; Philippe Vernon, chercheur au CNRS et Thierry Hance, professeur à l'université Catholique de Louvain-La-Neuve en Belgique, pour l'aide compétente qu'ils m'ont apportée, pour leurs encouragements pendant la thèse, et pour leurs commentaires et pour leur gentillesse. J'ai appris beaucoup de vous soit dans l'aspect appliqué soit dans l'aspect fondamental. Sans vous, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail. Je vous remercie d'avoir été disponibles jusqu'au bout, pour les derniers détails, et pour avoir beaucoup contribué à mettre en forme mon français très approximatif, en particulier Joan.

Merci aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ma thèse pour leurs remarques et suggestions qui m'ont permis d'améliorer la qualité de cette thèse. Merci à Jacques Brodeur, Jean-Claude Grégoire, Guy Boivin, Hervé Colinet et Jean-Sébastien Pierre.

J'adresse mes remerciements particuliers au professeur Jean-Sébastien Pierre, qui a toujours été disponible pour chaque problème statistique. Il a été le quatrième mousquetaire de cette thèse.

J'exprime aussi mes remerciements à Ecobio, l'équipe de Paysaclim, en particulier : Jocelyne Beven, et Sandra Rigaud pour leur aide administrative ; Olivier Troccaz pour son aide informatique en particulier pour la connexion vidéo-conférence avec le Canada. Je remercie également Annick Guyomard à l'école doctorale.

Je tiens à remercier Valérie Briand qui a vérifié la bibliographie de ma thèse et pour tous les articles et les livres que j'ai demandés.

J'aimerais remercier également les collègues d'Ecobio : Véro, Joffrey, Damien, Benoît, Benjamin, Laurent, Philippe, Thomas.

J'adresse mes remerciements à l'équipe (Earth and Life Institute) à l'université Catholique de Louvain en Belgique, où j'ai commencé ma première année de thèse, et où j'ai mangé de bonne frites et bu de la bonne bière. Merci en particulier à : Alexis Descamps, Brigitte Ferauge, Stéphane Deconinck, Chris Pels, Guillaume Le Goff, Isabelle Frère.

Je n'oublie pas de remercier toute l'équipe du laboratoire Ecobiologie des insectes parasitoïdes (Bat 25) à l'université de Rennes 1, qui ont accueilli mes parasitoïdes dans leur laboratoire pendant 2 ans.

J'aimerais aussi remercier Thierry Le Rouzo, le mari de Joan.

Je tiens remercier mes amis et mes cousins et leurs contacts pendant la thèse. Je remercie en particulier Baihas et son épouse Abye qui sont venus pour assister à ma présentation pour m'encourager.

Je dédie cette thèse à ma famille :

Mes frères : Moder, Manhl, Mazen.

Ma sœur unique Batoul, Je te souhaite une bonne continuation dans tes études

Et bien sûr, je n'oublie pas la personne que j'aime depuis notre connaissance à l'université,
Loulou.

Enfin pour mes parents qui m'ont encouragé et leur soutien moral et effectif pendant mon séjour en France. Je ne trouve aucun mot pour vous exprimer mes remerciements.

Chapitre 1

INTRODUCTION GENERALE

1. Présentation et définition de la lutte biologique

1.1. Définition

La lutte biologique est une méthode de lutte contre les populations d'espèces nuisibles par l'utilisation d'une autre espèce qui agit par prédation, parasitisme, pathogénicité ou compétition (Boivin 2001). Les méthodes de lutte biologique exploitent donc les mécanismes de régulation naturelle des populations de phytophages. Cette régulation résulte en un équilibre entre les insectes nuisibles et les auxiliaires dans l'environnement. "L'objectif de la lutte biologique est donc à terme de remplacer, en totalité ou en partie, les pesticides chimiques qui représentent actuellement la méthode la plus utilisée en agriculture et en foresterie pour protéger les cultures contre les ravageurs" (Boivin 2001). En effet, les résultats de la lutte chimique ne sont pas toujours satisfaisants à cause de l'apparition de souches résistantes, des conséquences sur l'appauvrissement de la biodiversité et de la toxicité des produits utilisés par les hommes (Jerraya & AL Rouechdi 2005). Eilenberg *et al.* (2001) considèrent que les agents majeurs de la lutte biologique sont des prédateurs, des parasitoïdes, des nématodes, ou des pathogènes contre les insectes nuisibles, des herbivores ou des pathogènes contre les mauvaises herbes ou des micro-organismes contre les pathogènes des plantes.

1.2. Les différentes méthodes de lutte biologique

Différentes stratégies de lutte biologique existent qui sont détaillées ci-dessous (Murdoch & Briggs 1996; Eilenberg *et al.* 2001; Hance 2001) :

1.2.1. La lutte biologique classique ou lutte biologique par acclimatation :

De nombreuses espèces d'insectes se sont acclimatées en dehors de leur aire d'origine. Elles ont généralement été transportées par l'homme ou sont arrivées accidentellement. Certaines de ces espèces sont des ravageurs des cultures et dans leur nouvel environnement, elles ne rencontrent pas d'ennemis naturels, et peuvent ainsi rapidement causer des dommages d'importance économique. La lutte biologique classique consiste à aller chercher des antagonistes dans la zone d'origine de ce nouveau ravageur. Il s'agit donc d'introduire une nouvelle espèce dans un environnement afin de contrôler des ravageurs qui sont également exotiques, et précédemment introduits. Par exemple, la cochenille australienne *Icerya purchasi* Maskell (Hemiptera: Margarodidae) a fait l'objet de la première opération de lutte biologique à grande échelle. Elle a été introduite accidentellement en 1868 aux Etats-Unis et

en l'absence de ses ennemis naturels, son taux de multiplication très élevé a conduit à l'observation de dégâts d'importance économique sur les cultures d'agrumes. Dix ans plus tard, ce ravageur menaçait de provoquer l'effondrement complet de l'agrumiculture. Pour lutter contre ce ravageur, la coccinelle *Rodolia cardinalis* Mulsant (Coleoptera : Coccinellidae) a été introduite en 1888 en Californie. Cette introduction représente un des premiers grands succès et le point de départ de la lutte biologique classique moderne (Greathead 1995).

De même, la cochenille du manioc *Phenacoccus manihoti* Mat-Ferr (Homoptera : Pseudococcidae), d'origine sud-américaine, a été introduite accidentellement dans les cultures de manioc africaines au Congo au début des années 1970, causant rapidement d'importants ravages dans cette culture vivrière capitale. Elle s'est surtout répandue rapidement dans toute la ceinture de culture du manioc, à l'exception de l'Ouganda et de Madagascar. En 1981, plusieurs espèces de parasitoïdes et de coccinelles provenant d'Amérique du Sud ont été acclimatées, mais quelques années après, seul le parasitoïde *Epidinocarsis lopezi* De Santis (Hymenoptera : Encyrtidae) était retrouvé. Il s'est acclimaté et a contribué au maintien des populations de cochenilles dans tous les pays où il a été relâché, sans nécessiter de nouvelles interventions (Hance 2001).

Ce type de lutte ne peut fonctionner que si l'auxiliaire s'acclimate lui aussi dans son nouvel environnement. Dans le cas contraire, il est possible de répéter l'introduction de ces auxiliaires une ou plusieurs fois par saison en petite quantité. C'est le cas d'*Encarsia formosa* utilisé à grande échelle depuis plusieurs dizaines d'années pour lutter contre l'aleurode des serres (van Lenteren & Woets 1988; Hoddle *et al.* 1998).

1.2.2. La lutte biologique par conservation

L'objectif est de modifier l'agrosystème ou les pratiques culturales afin de protéger et de favoriser la présence d'ennemis naturels locaux, facilitant ainsi leur capacité à contrôler les populations d'insectes nuisibles à un seuil économiquement satisfaisant (Hance 2001). Ce type de lutte biologique nécessite de connaître les conditions requises pour la survie et la multiplication des ennemis naturels. À l'heure actuelle, cette forme de lutte biologique est probablement la moins développée (Wajnberg & Ris 2009). Néanmoins, différentes stratégies ont été mises au point (Landis *et al.* 2000) : 1- Créer des abris ou des microclimats susceptibles de favoriser l'installation et la pérennisation des auxiliaires. 2- Mettre en place des sources de nourriture pour les auxiliaires adultes. 3- Protéger les ennemis naturels contre les pratiques agricoles qui les détruisent.

1.2.3. Le renforcement des populations d'ennemis naturels par lâchers inondatifs

Il est aussi possible de renforcer l'action des ennemis naturels préexistants en les élevant en masse et en les relâchant en grand nombre dans l'environnement au moment où les populations de ravageurs dépassent un certain seuil. Le but de cette méthode est de détruire rapidement les ravageurs. Par exemple, il a été démontré qu'il faut lâcher 20.000 *Aphidius rhopalosiphi* De Stefani-Peres (Hymenoptera : Braconidae) / ha chaque année pour lutter contre le puceron des céréales *Sitobion avenae* Fabricius (Homoptera : Aphididae) en Belgique (Levie *et al.* 2000; Levie *et al.* 2005a). La pyrale du maïs *Ostrinia nubilalis* Hübner est traitée au champ depuis plusieurs années avec succès par des lâchers inondatifs et saisonniers de 200 000 à 400 000 parasitoïdes de l'espèce *Trichogramma maidis* Pintureau et Voegelé (Hymenoptera, Trichogrammatidae) / ha dans le sud de la France. Cette méthode a été appliquée sur plus de 50 000 ha en 1998 (Frandon & Kabiri 1999).

Les lâchers inondatifs peuvent aussi être utilisés pour la lutte biologique sous serre, car les ennemis naturels ne pénètrent pas facilement dans les serres et il est donc nécessaire de renforcer leur action. De plus, les serres étant un milieu fermé, les parasitoïdes relâchés ne se dispersent pas et ce type de lutte présente souvent de bien meilleurs résultats que la lutte biologique au champ. Actuellement, des programmes de lutte biologique sont appliqués dans plus de 37000 ha sous serre (van Lenteren 2006; Parrella 2008), en relâchant 2500 à 10 000 individus par hectare (van Lenteren 2003a), et donc au total plusieurs milliards d'individus. Par exemple, pour la lutte biologique contre la mouche blanche *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera : Aleyrodidae), un ravageur important des cultures de légumes et des plantes ornementales sous serre, on relâche régulièrement le parasitoïde *Encarsia formosa* De Santis (Hymenoptera : Aphelinidae) lors des pics de présence du ravageur (van Lenteren & Woets 1988). Actuellement, les ennemis naturels sont utilisés sur 100.000 ha en Europe et sur une superficie totale mondiale estimée à 16 millions d'hectares (van Lenteren, 2003a).

Les facteurs principaux pour le succès de cette méthode sont d'être capables de produire une grande quantité d'ennemis naturels au même moment et de déterminer le moment optimal où lâcher ces ennemis pour qu'ils soient efficaces contre les ravageurs (Hance 2001). Pour cela, il est nécessaire de mettre au point des techniques d'élevage en masse de ces insectes. C'est pourquoi de nombreuses recherches se focalisent sur cet objectif. Les résultats de ces études ont montré que le stockage au froid semble la méthode la plus

efficace pour conserver de grandes quantités de parasitoïdes avant de les lâcher dans l'environnement (Leopold 1998; Rigaux *et al.* 2000; Lysyk 2004; Levie *et al.* 2005a).

Cette thèse s'intéresse aux méthodes de stockage au froid des Hyménoptères parasitoïdes, avec l'objectif d'améliorer leur efficacité.

Un parasitoïde est un insecte qui se développe sur ou dans un autre insecte (son hôte), en tire sa subsistance et le tue en résultat direct ou indirect de son développement (Godfray 1994). Les parasitoïdes occupent une place importante dans les écosystèmes naturels puisque l'on estime qu'ils sont responsables d'un taux de mortalité des ravageurs supérieur à celui causé par les prédateurs et les microorganismes réunis (Boivin 2001). Ce mode de vie est intermédiaire entre le parasitisme « vrai » puisque les larves grandissent en se nourrissant aux dépens de l'hôte, et la prédation puisque l'hôte est systématiquement tué.

On retrouve des parasitoïdes dans six ordres d'insectes (Boivin 2001) : Hyménoptères, Coléoptères, Diptères, Neuroptères, Lépidoptères et Trichoptères. L'importance économique des parasitoïdes varie d'un ordre à l'autre. Parmi les parasitoïdes utilisés en lutte biologique 87.3% sont des Hyménoptères, 12.5% des Diptères et 0.2% des Coléoptères (Boivin 2001). Les Hyménoptères parasitoïdes représentent le groupe d'organismes le plus important en lutte biologique, qui est impliqué dans la majorité des succès tant du point de vue économique qu'environnemental (LaSalle 1993). Parmi les familles d'Hyménoptères, celle des *Braconidae* par exemple contient jusqu'à 15 000 espèces (Zaldivar-Riveron *et al.* 2006).

L'utilisation des parasitoïdes en lutte biologique offre plusieurs avantages. Ils ont de bonnes capacités de dispersion, de découverte et de localisation de l'hôte (Starý 1987), et souvent une bonne spécificité d'hôte, même s'il existe des parasitoïdes généralistes qui parasitent plusieurs espèces de ravageurs. Enfin, ils sont inoffensifs pour la santé humaine (Hance 2001).

2. Le stockage au froid

Le stockage est une méthode d'exposition au froid utilisée en lutte biologique, dans le but de produire simultanément un grand nombre d'ennemis naturels, afin qu'ils soient disponibles aux moments opportuns quand les cultures sont affectées par des ravageurs (Bueno & van Cleave 1997). La possibilité de stocker les ennemis naturels a commencé être étudiée il y a plus de 70 ans (Hanna 1935; King 1943, Leopold 1998). Depuis cette date, de nombreuses espèces d'ennemis naturels utiles (parasitoïdes ou prédateurs) sont commercialisées et

produites en masse par des entreprises pour contrôler des ravageurs (par exemple *Aphidius ervi*, *Encarsia formosa*, *Trichogramma chilonis*). Enfin, le stockage au froid facilite également les conditions de l'expédition des ennemis naturels dans les sites où ils doivent être relâchés (Whitaker-Deerberg *et al.* 1994).

Leopold (1998) définit deux types de stockage au froid, le premier, 'à court terme', qui implique un stockage ayant une durée inférieure à un mois, et le second, 'à long terme', qui fait référence à des durées de stockage au froid supérieures à un mois. Il a été considéré que le stockage de longue durée (en utilisant la diapause) est préférable pour les entreprises parce qu'il est plus économique car il permet de diminuer les frais de production, et il permet d'avoir des auxillaires disponibles à n'importe quel moment (van Lenteren 2003a).

La conservation au froid des espèces utilisées en lutte biologique est généralement réalisée à des températures allant de -5°C à 10°C en fonction des espèces (Leopold 1998; Levie *et al.* 2005b).

Le stockage au froid représente un stress pour les insectes stockés. Nous présenterons successivement l'impact des températures froides sur les parasitoïdes en conditions naturelles, puis les effets négatifs du stockage au froid en conditions de laboratoire et les différentes méthodes d'amélioration des conditions de stockage au froid.

2.1. Impact des températures froides sur les ectothermes en conditions naturelles

Les conditions climatiques sont des facteurs abiotiques qui ont des effets sur l'abondance, le développement, la reproduction et la distribution des ectothermes ainsi que sur les relations entre les espèces (Bale 2002). Le facteur abiotique le plus important est la température qui affecte les performances des ectothermes (Huey & Kingsolver 1989). Ces performances augmentent progressivement du minimum thermique critique jusqu'à l'optimum, puis diminuent rapidement (i.e. la température létale) (Fig. 1). Cette zone où les performances sont maintenues, correspond à la gamme de températures qui est tolérée par un individu (Denlinger & Yocum 1998).

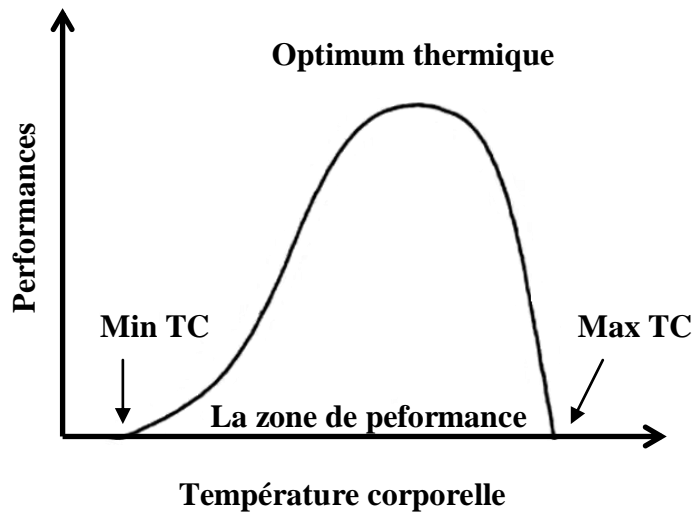


Figure 1. Courbe de performance d'un organisme ectotherme en fonction de la température corporelle (modifié d'après Huey & Kingsolver, 1989 et Colinet 2007). **Min TC = Minimum thermique critique. Max TC : Maximum thermique critique.**

2.2. Les stratégies de résistance aux basses températures (résistance à la congélation) chez les insectes :

Les insectes parvenant à survivre après une exposition au froid, peuvent souffrir de dommages sub-létaux affectant le développement, la reproduction et la longévité (Hutchinson & Bale 1994). Si l'exposition au froid affecte les stades de développement larvaires, les adultes issus de ces larves peuvent aussi présenter des anomalies morphologiques qui empêchent le vol, s'opposent à l'accouplement ou rendent plus aléatoire la recherche de ressources trophiques (Bale *et al.* 1989b).

Lorsque la température diminue et passe en-dessous de 0°C, les insectes présentent deux grands types de stratégies pour résister au gel : l'intolérance et la tolérance à la congélation. Les insectes intolérants à la congélation ont une capacité de surfusion élevée, c'est-à-dire que leurs tissus ne gèlent pas pour des températures inférieures au point de fusion (melting point) ; quand la température cristallisation ou « supercooling point, SCP » est atteinte, les fluides corporels gèlent spontanément. Déshydratation, concentrations élevées en substances cryoprotectrices (sucres, polyols), élimination des agents nucléants, concourent à

ces capacités élevées de surfusion. Les insectes tolérants à la congélation ont en général une faible capacité de surfusion et tolèrent la congélation extracellulaire ; ils présentent fréquemment de fortes capacités de nucléation des cristaux de glace et contiennent également des substances cryoprotectrices.

La survie au froid peut être tout aussi problématique que la survie au gel car les effets cumulatifs du froid (durée d'exposition aux basses températures) fragilisent souvent les insectes dont les taux de mortalité peuvent alors augmenter significativement (Bale 1987, 1991).

Intolérance et tolérance à la congélation ne constituent toutefois que les deux extrémités d'un dichotomique. Afin de prendre en compte la réelle diversité des situations rencontrées dans la nature, Bale (1996) a proposé, de manière plus détaillée, de classer les espèces en cinq catégories, allant des insectes les plus résistants aux moins résistants à ces basses températures :

- Espèces tolérant la congélation (freeze tolerance) : gel extra-cellulaire ; la température létale est inférieure à la température de cristallisation. Exemple : le Diptère *Eurosta solidaginis* (Bale *et al.* 1989a).
- Espèces ne tolérant pas la congélation (freeze avoidance, freeze susceptibility) : la température létale est égale à la température de cristallisation. Exemple : le papillon nocturne *Epirrita autumnata* (Bale & Hayward 2010).
- Espèces tolérant certains dommages dus au froid (chill tolerant) : il s'agit d'espèces pouvant supporter l'exposition à des températures basses (inférieures à 0°C), avec un certain taux de mortalité. La température létale est supérieure à la température de cristallisation. Exemple : *Rhynchaenus fagi* (Bale 1991).
- Espèces tolérant mal les dommages dus au froid (chill susceptibility) : il s'agit d'espèces moins résistantes au froid que dans la catégorie précédente. La température létale est en générale bien supérieure à la température de cristallisation. Exemple : le puceron *Myzus persicae* (Bale *et al.* 1988). Il est probable que *Aphidius ervi*, espèce ne tolérante pas le froid, se rapproche davantage de cette catégorie que de la précédente (Langer & Hance 2000).
- Espèces opportunistes (opportunistic survival) : il s'agit d'espèces peu résistantes au froid qui, comportementalement, s'affranchissent de la contrainte thermique. Exemple : le Diptère *Musca domestica* (Coulson & Bale 1990).

2.3. Impacts négatifs du stockage au froid

Même si les insectes présentent de nombreuses adaptations aux conditions hivernales dans la nature, le stockage au froid en laboratoire peut poser des problèmes aux insectes stockés. Ces effets négatifs augmentent généralement avec la diminution de la température et l'augmentation de la durée du stockage (Amice *et al.* 2008). Il existe une énorme variation inter-spécifique concernant les capacités des différentes espèces de parasitoïdes à résister à une température ou une durée de stockage donnée (Hofsvang & Hagvar 1977; Leopold 1998; Lysyk 2004; Lopez & Botto 2005; Pandey & Johnson 2005). Mais dans tous les cas, les problèmes liés au stockage portent principalement sur les taux d'émergence et différents paramètres de la fitness.

Dans la plupart des cas, les individus souffrent de dommages cumulatifs qui peuvent parfois être létaux (Hance *et al.* 2007). Lorsque ces dommages sont létaux, une réduction significative de la proportion de survivants sera donc observée, c'est-à-dire des individus capables de terminer leur développement et d'émerger après le stockage. Trois causes principales peuvent expliquer cette mortalité (De Bach 1943) : tout d'abord, les dommages directement liés au froid (diminution progressive de la température ou choc thermique), tels que ceux affectant les membranes des cellules (Bale 1987). Puis ceux liés à la déshydratation : en effet, il a été noté une diminution de la masse en eau pendant le stockage. Enfin, les parasitoïdes stockés consomment une part de leurs réserves énergétiques, ce qui diminue ces réserves pour la suite du développement après la phase de stockage (Leopold 1998).

Lorsque les dommages n'ont pas affecté directement la survie des individus exposés, les survivants ressortent généralement affaiblis après le stockage au froid (effets sub-létaux indirects). Ces dommages dénotent une réduction de la valeur adaptative des individus (Turnock & Bodnaryk 1991), marquée notamment au niveau de la longévité (*A. colemani* : Colinet *et al.* 2006a; *Trichogramma evanescens* : Ayvaz *et al.* 2008), la fécondité (*T. ostrinia* : Pitcher *et al.* 2002; *Telenomus busseolae* : Bayram *et al.* 2005; *A. rhoplosiphi* : Levie *et al.* 2005b), la stérilité des mâles et des femelles (*Euchalcidia caryobory* : Hanna 1935; *A. rhoplosiphi* : Levie *et al.* 2005b). Des études montrent parfois une augmentation de la proportion de mâles dans le sexe ratio de la descendance (*Apanteles galleriae* : Uçkan & Gülel 2001; *A. colemani* : Colinet *et al.* 2006a). Plusieurs études ont également démontré une augmentation de la durée de développement (*Muscidifurax sp.* : Lysyk 2004; *A. colemani* : Colinet & Hance 2009), des augmentations de la proportion d'individus malformés au niveau des organes reproducteurs (*Euchalcidia caryobory* : Hanna 1935) ou des antennes (*A. rhoplosiphi* : Bourdais *et al.* 2006), ainsi que des réductions de la taille des émergents

(*Trichogramma carverae* : Rundle *et al.* 2004). Des altérations du comportement de ponte (*A. picipes* : Amice *et al.* 2008), ainsi que de la capacité de mobilité et de vol (*Rhizophagus grandis* : Coullien & Gregoire 1994; *Encarsia formosa* et *Eretmocerus eremicus* : Luczynski *et al.* 2007; *T. evanescens* : Ayvaz *et al.* 2008) ont également été mises en évidence.

En conclusion, le stockage des parasitoïdes à basse température est susceptible de causer de nombreux problèmes, allant d'une baisse du taux d'émergence à des modifications comportementales pouvant diminuer les performances des mâles et des femelles. Ces problèmes peuvent entraîner des impacts sérieux sur le succès des programmes de lutte biologique (Rigaux *et al.* 2000).

2.4. Comment limiter les effets négatifs du stockage au froid ?

Suite à la prise en compte de tous les effets négatifs du stockage, de nombreuses études ont été réalisées dans le but de diminuer ces effets négatifs.

2.4.1. Le choix du stade et de l'âge au sein d'un stade

Plusieurs études ont comparé les effets du stockage au froid chez différents stades des ennemis naturels (œuf, larve, nymphe et adulte) selon les espèces, mais ce sont le plus souvent des stades immatures qui supportent le mieux le stockage (le stade d'œuf chez les prédateurs ou le stade de la nymphe chez les parasitoïdes). En effet, le stockage des adultes induit plus de dommages sur les individus que le stockage des stades immatures (van Lenteren & Tommasini 2003). Ces deux choix ont pris en compte la facilité de d'utiliser des stades immobiles. Le tableau (1) présente quelques exemples de quel est le stade choisi préférentiellement pour le stockage chez différentes espèces d'ennemis naturels. Ici, nous observons que les prédateurs ont été majoritairement stockés au stade œufs, et que les parasitoïdes ont été majoritairement stockés au stade nymphal.

Ces études ont aussi permis de mettre en évidence une variabilité de la tolérance au stockage au froid en fonction de l'âge de chaque stade utilisé. Par exemple Levie *et al.* (2005b) ont montré que les momies âgées d'un jour chez *Aphidius rhopalosiphii*, donc contenant un parasitoïde au stade pré-nymphal, sont le stade qui supporte le mieux le froid, par rapport aux momies plus âgées.

Tableau 1. Stade de développement choisi chez les insectes prédateurs et parasitoïdes pour le stockage au froid.

Stade	Ennemi naturel	Famille	Ordre	Type	Référence
œuf	<i>Coccinella septempunctata</i>	Coccinellidae	Coleoptera	Prédateur	Hamalainen & Markkula (1977)
œuf	<i>C. undecimpunctata</i>	Coccinellidae	Coleoptera	Prédateur	Abdel-Salam & Abdel-Baky (2000)
œuf	<i>Adalia bipunctata</i>	Coccinellidae	Coleoptera	Prédateur	Hamalainen & Markkula (1977)
œuf	<i>Podisus maculiventris</i>	Pentatomidae	Heteroptera	Prédateur	De Clercq & Degheele (1993)
œuf	<i>Chrysoperla carnea</i>	Chrysopidae	Neuroptera	Prédateur	Osman & Selman (1993)
œuf	<i>Franklinothrips vespiformis</i>	Aeolothripidae	Thysanoptera	Prédateur	Larentzaki <i>et al.</i> (2007)
Larve	<i>C. undecimpunctata</i>	Coccinellidae	Coleoptera	Prédateur	Abdel-Salam & Abdel-Baky (2000)
Pupe	<i>C. undecimpunctata</i>	Coccinellidae	Coleoptera	Prédateur	Abdel-Salam & Abdel-Baky (2000)
Pupe	<i>Chrysoperla carnea</i>	Chrysopidae	Neuroptera	Prédateur	Osman & Selman (1993)
Pré-nymph	<i>Aphidius matricariae</i>	Braconidae	Hymenoptera	Parasitoïde	Shalaby & Rabasse (1979)
Pré-nymph	<i>A. rhopalosiphii</i>	Braconidae	Hymenoptera	Parasitoïde	Levie <i>et al.</i> (2005b)
Pré-nymph	<i>A. colemani</i>	Braconidae	Hymenoptera	Parasitoïde	Colient <i>et al.</i> (2006a,b)
Pré-nymph et nymphe	<i>Encarsia formosa</i>	Aphelinidae	Hymenoptera	Parasitoïde	Pandey & Johnson (2005)
Nymph	<i>E. formosa</i>	Aphelinidae	Hymenoptera	Parasitoïde	Luczynski <i>et al.</i> (2007)
Nymph	<i>Eretmocerus eremicus</i>	Aphelinidae	Hymenoptera	Parasitoïde	Luczynski <i>et al.</i> (2007)
Adult	<i>Chrysoperla carnea</i>	Chrysopidae	Neuroptera	Prédateur	Tauber <i>et al.</i> (1993)
Adult	<i>Franklinothrips vespiformis</i>	Aeolothripidae	Thysanoptera	Prédateur	Larentzaki <i>et al.</i> (2007)
Adult	<i>Gonatocerus ashmeadi</i>	Mymaridae	Hymenoptera	Parasitoïde	Chen <i>et al.</i> (2008b)

2.4.2. Impact de la photopériode

La photopériode est un signal de l'environnement souvent utilisé par les insectes pour évaluer la période de l'année et ajuster en conséquence leur cycle de vie et en particulier la mise en place et la levée de la diapause (Danks 1994; Yadav *et al.* 2008). En effet, la photopériode peut affecter certains paramètres de développement, de survie, ou encore de fitness. Par exemple, Yadav *et al.* (2008) ont montré qu'en élevant des pupes de *Micomus tasmaniae* Walker (Neuroptera: Hemerobiidae) sous deux régimes de photopériode différents (16L : 8D et 12L : 12D), les émergents sous le régime de jours courts présentaient une fécondité et une fertilité réduite par rapport à ceux élevés sous une photopériode estivale. En revanche, aucune différence n'a été observée dans le taux d'émergence pour ces deux régimes.

Peu d'études se sont intéressées à l'influence de la photopériode sur la résistance au froid chez les ectothermes. Par exemple, il a été observé qu'une alternance jour-nuit induit une tolérance au froid plus grande chez les larves de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) qu'une condition photopériodique constante (obscurité ou lumière continues). Par contre, les différents régimes de photopériode cyclique (8 : 16 ; 12 : 12 ; et 16 L : 8 D) n'ont pas induit de différences dans la résistance au froid chez la même espèce (Kim & Song 2000).

Jusqu'à présent, nous n'avons trouvé qu'une étude qui prenne en compte l'éventuel effet de la photopériode sur le stockage au froid chez les parasitoïdes. Ganteaume *et al.* (1995) ont montré que le stockage des nymphes d'*Encarsia formosa* à 9°C pendant 15 jours en jours longs (15L : 9D) a amélioré la longévité des individus émergents par rapport au stockage en jours courts (11L : 13D). Aucun effet sur la fécondité n'a été observé.

En conclusion, il est probable que la photopériode puisse avoir des effets sur le stockage au froid, mais trop peu d'études sont disponibles pour généraliser à quels niveaux ces effets se manifestent.

2.4.3. Impact de la diapause ou de la quiescence

La diapause et la quiescence sont des phénomènes qui permettent aux individus de survivre pendant les périodes où les conditions environnementales sont défavorables (Tauber *et al.* 1986). La différence entre les deux termes est que la quiescence est un cas d'arrêt de développement en réponse immédiate aux conditions environnementales défavorables et que le développement reprend immédiatement quand les conditions redeviennent favorables (Saunders 1982 ; Tauber *et al.* 1986). La diapause est une période d'arrêt de développement combinée avec des modifications physiologiques, avec le développement pas nécessairement la reprise sur le retour de conditions favorables (Tauber *et al.* 1986).

Concernant l'utilisation de ces deux phénomènes dans le stockage au froid, on pourrait stocker des parasitoïdes quiescents pour une courte période (Jalali and Singh 1992 ; Levie 2005 ; Colinet 2007 ; Ayvaz *et al.* 2008), alors qu'on pourrait stocker des parasitoïdes diapausants pour une période plus longue (Boivin 1994 ; Rundle *et al.* 2004 ; Garcia *et al.* 2009).

Il a été montré que les individus diapausants ont la capacité de supporter le froid plus facilement que les non diapausants. Langer & Hance (2000) ont montré que la survie chez les momies diapausantes d'*A. ervi* et *A. rhopalosiphii* après stockage à 0°C était plus élevée que celle des non-diapausantes, pour des durées de stockage de 20 et 30 jours. De même, les larves diapausantes d'*Aphidoletes aphidimyza* Rodani (Diptera : Cecidomyiidae) ont une capacité plus élevée de résistance au froid après stockage à 3°C que les larves non diapausantes (Kostal *et al.* 2001).

Des recherches sur le stockage des parasitoïdes diapausants pour une longue période ont été faites particulièrement sur les *Trichogrammes*, du fait de la facilité d'induire la diapause dans ce genre (Bigler 1994 ; Boivin 1994; Garcia *et al.* 2002; Ma & Chen 2006 ; Pizzol & Pintureau 2008).

Cette capacité élevée de résistance au froid peut être reliée au fait que les individus diapausants interrompent ou minimisent toutes leurs activités métaboliques par rapport aux individus non-diapausants (Kostal *et al.* 2001; Kostal *et al.* 2004). De plus, il a été observé que les individus qui se préparent à entrer en diapause accumulent des réserves lipidiques importantes pour résister à l'exposition prolongée aux basses températures (Danks 1991; Danks 2006).

2.4.4. Impact de l'acclimatation

De nombreuses études mettent en évidence l'effet positif sur la résistance au froid d'un processus d'acclimatation avant l'exposition aux basses températures. L'acclimatation est un phénomène naturel qui permet à de nombreuses espèces d'insectes de s'acclimater ou de s'adapter aux conditions hivernales. Des recherches fondamentales ont été menées sur le terrain et au laboratoire pour comprendre les processus d'acclimatation. Les résultats de ces recherches sont actuellement utilisés en recherche appliquée sur les parasitoïdes (Leopold *et al.* 1998), pour améliorer leurs performances après le stockage au froid et permettre ainsi d'augmenter la durée du stockage.

Le terme d'acclimatation correspond à deux types de processus (Bowler 2005) : l'acclimatation à long terme (acclimation) et l'acclimatation à court terme (hardening). La

réponse des organismes au stress sera considérée comme une acclimatation à long terme quand elle se fait sur une longue période avec des conditions de stress modéré, alors qu'elle sera considérée comme une acclimatation à court terme lorsqu'elle se fait sur une courte période avec des conditions de stress plus importantes (Bowler 2005). Cette acclimatation entraîne des modifications morphologiques, physiologiques, écologiques et comportementales des organismes qui leur permettent une tolérance à des conditions extrêmes (Hammill *et al.* 2004; Bowler 2005). Par exemple, l'adaptation physiologique aboutit à la production de sucres, d'acides aminés et de lipides cryoprotecteurs protègent les cellules des organismes (Andreadis *et al.* 2005).

L'acclimatation dans le cadre du stockage au froid des parasitoïdes consiste en une diminution graduelle de la température des individus que l'on souhaite stocker : au lieu de placer directement les parasitoïdes de la température d'élevage à la température de stockage, il est possible de diminuer progressivement la température, ce qui a un effet positif sur la survie et la valeur sélective des émergents (Bueno & van Cleave 1997; Rigaux *et al.* 2000; Levie *et al.* 2005b). Par exemple Levie *et al.* (2005b) ont mis en évidence que le meilleur système d'acclimatation pour faire passer des momies d'*Aphidius rhopalosiphi* de 20°C à -5°C, consistait à diminuer la température progressivement par paliers de 2 h à 15, 10, 5, et 0°C.

2.4.5. Impact des régimes de températures fluctuantes

Il a été démontré récemment qu'il est possible de soumettre les ectothermes stockés à une température fluctuante plutôt qu'à une température constante lors d'une exposition prolongée à des basses températures. Le régime de température fluctuante peut être défini comme une période de froid interrompue par un retour à une température plus élevée pour une courte période (Bale 1991). Ce protocole semble améliorer le taux d'émergence et la fitness des survivants chez différentes espèces d'insectes (Leopold *et al.* 1998; Renault *et al.* 2004).

Trois études ont utilisé le régime de températures fluctuantes pour améliorer le stockage au froid chez les ennemis naturels (Rudolf *et al.* 1993; Colinet *et al.* 2006b; Chen *et al.* 2008b). Les résultats obtenus par Colinet *et al.* (2006b) montrent une amélioration de la survie d'*Aphidius colemani* (Hymenoptera : Braconidae), après avoir utilisé une température fluctuante (remontée 2 heures par jour à 20°C pendant le stockage à 4°C) plutôt qu'une température constante de 4°C. Les auteurs émettent l'hypothèse que cette brève remontée de température à 20°C lors du stockage provoque une augmentation de l'activité métabolique,

qui serait responsable de la baisse des dommages liés au stockage au froid (Colinet *et al.* 2006b).

2.5. Les coûts physiologiques et la sélection

Un individu exposé au stress subit une altération des composantes de sa fitness. Comme nous l'avons précédemment dit, la perte de fitness augmente avec la diminution de la température et l'augmentation de la durée d'exposition (Pitcher *et al.* 2002; Rundle *et al.* 2004; Lopez & Botto 2005). Cependant, mesurer les coûts physiologiques dans une population après un stress varie selon le taux de mortalité. Dans le cas où il n'y a pas de mortalité, ces coûts sont représentatifs de toute la population. Dans le cas où la mortalité augmente, les survivants ne représentent probablement pas toute la population, à cause de la variabilité phénotypique ou génétique (Wajnberg 2004). Par contre, dans le cas d'un fort taux de mortalité, deux situations se présentent pour les survivants. Dans un premier cas, l'étude d'Amice *et al.* (2008) sur le parasitoïde *Aphidius avenae* Haliday a mis en évidence que lorsque le taux de mortalité était très important, les rares survivants avaient des paramètres de fitness égaux ou supérieurs à ceux des témoins non exposés, mettant en évidence des phénotypes extrêmes, c'est-à-dire des individus qui sont les mieux acclimatés ou adaptés à ce type de stress (Leopold 1998; Amice *et al.* 2008). Selon Danks (1983), ces survivants pourraient être considérés comme des individus extrêmes dans la population. Dans un second cas, après une forte mortalité, les survivants présentent une grande variabilité, avec en moyenne une baisse dans leurs paramètres de fitness par rapport aux témoins non exposés (Chen *et al.* 2008b).

Aucune étude n'a mesuré les premiers coûts physiologiques liés au stockage au froid, ce qui ne peut se faire que sur une population d'individus émergeant après un stockage n'induisant qu'un taux de mortalité négligeable. Pour mesurer les coûts physiologiques induits par le stockage à froid, il est nécessaire tout d'abord d'appliquer un niveau de stress qui ne cause pas de mortalité significative (Amice *et al.* 2008).

3. Qu'est-ce que la « qualité » chez les parasitoïdes ?

Dans les programmes de lutte biologique, le nombre de parasitoïdes produits est important, mais il faut ensuite s'intéresser à la qualité des individus produits (van Lenteren 2003b). L'amélioration de la qualité dans la production commerciale des ennemis naturels a été l'objectif majeur de l'association des producteurs de lutte biologique naturelle en Amérique du Nord et en Europe pendant les dernières années (van Lenteren 2003a; Penn *et al.* 1998).

Par exemple, il y a 26 entreprises en Europe et 10 entreprises en Amérique du Nord (van Lenteren 1997). Beaucoup plus d'espèces d'ennemis naturels sont disponibles dans le commerce en Europe qu'aux États-Unis, principalement en raison de l'effet d'une industrie plus importante en Europe (van Lenteren *et al.* 1997). Le nombre d'espèces d'ennemis naturels vendus est passé de moins de 10 espèces en 1970 à plus de 125 espèces en 2000 (Sigsgaard 2005).

La qualité des ennemis naturels a été évaluée par l'Organisation Internationale de Lutte Biologique selon les critères suivants (Sigsgaard 2005) : le sexe-ratio (au moins 50% de femelles), le nombre de femelles à relacher par hectare, la longévité, la fécondité et la capacité à parasiter des hôtes.

Le succès de la lutte biologique commerciale est principalement dépendant de la qualité des ennemis naturels, qui sont produits par l'élevage en masse dans ces entreprises. Lors de la production, il est nécessaire de vérifier si un ennemi naturel est toujours capable de contrôler le ravageur lors du lâcher inondatif ou du lâcher inoculatif en particulier en culture sous serre (Sigsgaard 2005).

Pour assurer le succès d'un programme de lutte biologique, la qualité des parasitoïdes émergeant après le stockage est essentielle. Pour un producteur d'insectes destinés à être utilisés lors de lâchers inondatifs, il est important que ces insectes soient efficaces sur le terrain. Les qualités recherchées pour un programme de stockage sont un fort taux d'émergence, la production d'un nombre maximal de femelles, une fécondité importante de ces femelles en particulier en début de vie, et la production d'individus capables d'avoir les comportements adéquats après le stockage (capacité pour les mâles à rechercher des femelles et à s'accoupler avec capacité de ponte des femelles). Ces facteurs peuvent aussi être appréciés à travers le taux d'accroissement des individus après différents programmes de stockage. Les différents points liés à la qualité des émergents obtenus après stockage seront présentés ci-dessous : tout d'abord, les paramètres permettant de mesurer la fitness des émergents, puis les aspects de production liés au taux d'accroissement.

3.1. Qualité et fitness

Un indicateur de la qualité chez les parasitoïdes est la taille, car il a été démontré que la taille influence un grand nombre de traits de vie. Dans la majorité des études on observe que la fitness augmente avec la taille chez différentes espèces des parasitoïdes (Godfray 1994; West *et al.* 1996; Eijs *et al.* 1998). Une grande taille pourrait influencer positivement la fitness des

femelles en affectant leur capacité de recherche d'hôtes (Visser 1994), leur longévité, et leur fécondité (Roitberg *et al.* 2001; Doyon & Boivin 2005). De la même façon, une grande taille pourrait influencer positivement la fitness des mâles en déterminant leur longévité, l'issue de la compétition avec d'autres mâles pour les femelles, leur mobilité et leur capacité à localiser des femelles (Grant *et al.* 1980; Sagarra *et al.* 2001), ainsi que leur capacité d'accouplement (Godfray 1994).

Il a été démontré que les femelles mères pondent généralement leurs descendants femelles dans les grands hôtes et leurs descendants mâles dans les petits hôtes (Charnov *et al.* 1981; Seidl & King 1993). En effet, il a été mis en évidence que les femelles sont relativement plus affectées dans leurs fitness quand elles se développent dans les petits hôtes plus que les mâles (Charnov *et al.* 1981; Sequeira & Mackauer 1992).

Il a été démontré que la taille des parasitoïdes était liée positivement avec la quantité de réserves lipidiques qu'ils ont pu extraire de l'hôte pendant leur développement (Ellers 1996; Ellers & vanAlphen 1997; Olson *et al.* 2000; Kalule & Wright 2005), et avec leur taux métabolique (Chown & Gaston 1999; Glazier 2005).

3.2. Les réserves lipidiques

Chez les insectes, les ressources énergétiques sont majoritairement stockées sous forme de lipides (Rivero & West 2002; Jervis *et al.* 2008). Toutefois, ils stockent et utilisent aussi d'autres nutriments tels que les hydrates de carbone (i.e. les sucres libres : glucose, fructose, sucrose, tréhalose, etc., et le glycogène) et les protéines. Chez les insectes, les réserves lipidiques jouent un rôle essentiel lors du stockage au froid (Leopold *et al.* 1998; Colinet *et al.* 2006a). Durant les expositions prolongées au froid, les individus sont susceptibles de perdre une proportion importante de leur poids, suite à l'épuisement de leurs réserves énergétiques. Ces réserves énergétiques corporelles, qui servent de 'carburant' pour maintenir le métabolisme basal, peuvent par conséquent jouer un rôle critique pour la survie au froid, et dans la tolérance aux blessures indirectes lors d'expositions prolongées au froid (Pullin 1987; Chen & Walker 1994; Lavy *et al.* 1997; Hoffmann & Harshman 1999; Renault *et al.* 2003). La survie et la résistance au jeûne sont aussi directement liées à ce stock de réserves (Cushman *et al.* 1993; Eijs *et al.* 1998; Hoffmann & Harshman 1999).

Contrairement à d'autres insectes (Ziegler 1997; Ziegler & Ibrahim 2001), les réserves lipidiques représentent chez de nombreuses espèces de parasitoïdes un stock limité et non remplaçable (Ellers *et al.* 1998; Rivero & West 2002) car il a été démontré que la majorité des parasitoïdes ne pouvaient pas synthétiser de lipides à partir des éléments nutritifs qu'ils

obtiennent en tant qu'adultes (Ellers 1996; Giron & Casas 2003; Visser & Ellers 2008; Visser *et al.* 2010). Les réserves lipidiques des adultes émergents peuvent être utilisées pour produire des œufs, qui restent dans les ovaires jusqu'à la ponte, ou peuvent être utilisées directement pour la maintenance, la mobilité, les « réparations », le métabolisme, etc. (Ellers & vanAlphen 1997; Gillooly *et al.* 2001; Arrese & Soulages 2010). Il est évident que les grands individus émergent avec plus de réserves que les petits (Rivero & West 2002), peuvent plus efficacement mobiliser leurs ressources métaboliques pour la fitness (Bezemer *et al.* 2005). En conséquence, disposer d'individus plus grands à l'émergence après le stockage devrait être plus rentable dans le domaine de la lutte biologique.

3.3. Le taux métabolique

Le taux métabolique a été mesuré soit par la détermination de la consommation de l'oxygène, ou par détermination de la libération de CO₂ (Nespolo *et al.* 2003). En général, c'est le métabolisme de base (le taux minimal d'un organisme inactif au laboratoire) qui a été mesuré par les physiologistes, et qui représente l'énergie consommée pour la survie (Clarke 1993). Le métabolisme est relié à plusieurs facteurs (abiotiques et intrinsèques) dont principalement la température (Gillooly *et al.* 2001; Terblanche & Chown 2007; Le Lann 2009), la taille (Chown & Gaston 1999; Niven & Scharlemann 2005), le sexe (Rogowitz & Chappell 2000), l'âge (Terblanche *et al.* 2004; Piironen *et al.* 2010), et le régime alimentaire (Gray & Bradley 2003). Cependant la dépendance du taux de métabolisme vis-à-vis des différents facteurs biotiques et abiotiques peut avoir une influence sur la fitness des individus (Sibly & Calow 1987; Le Lann 2009).

Comme les processus métaboliques sont à la base de la répartition de l'énergie entre la maintenance, la reproduction et la locomotion (Gillooly *et al.* 2001), un changement du taux de métabolisme devrait modifier la relation entre ces caractères (Sibly & Calow 1987). Un taux métabolique plus élevé peut entraîner un compromis différent entre deux traits de fitness. Un compromis évolutif est une relation négative entre deux traits, impliquant que lorsqu'un organisme dépense de l'énergie dans un trait, cela se fait aux dépens du second. Les deux traits sont directement reliés aux réserves lipidiques et au taux de métabolisme. Par exemple, un compromis existe entre l'investissement dans la capacité de vol (musculature) et la fécondité chez *Gryllus firmus* (Crnokrak & Roff 2002). Il y a également un compromis entre la longévité et sa fécondité chez *Asobara tabida* (Ellers 1996; Ellers *et al.* 1998). Le lien entre le taux de métabolisme, la taille et la fitness, n'est pas simple à établir et semble être différent selon les espèces étudiées. En fonction de cette relation, deux hypothèses contradictoires ont

été proposées expliquant la consommation des réserves lipidiques. Dans la première hypothèse (The Absolute Energy Demand), le taux de métabolisme augmente avec la taille (Calder 1984; Gillooly *et al.* 2001; Glazier 2005). En conséquence, les grands individus ont besoin de plus d'énergie pour remplacer l'énergie consommée pour maintenir leurs fonctions (Blanckenhorn *et al.* 1995; Blanckenhorn 2005; Reim *et al.* 2006a). Dans la deuxième hypothèse (The Relative Efficiency), le taux de métabolisme augmente proportionnellement plus faiblement avec la taille (Lehmann *et al.* 2000; Glazier 2005; Blanckenhorn *et al.* 2007; Savage *et al.* 2007), ce qui implique que les grands individus utilisent leur énergie de façon plus efficace pour maintenir leurs fonctions biologiques (Reim *et al.* 2006b; Blanckenhorn *et al.* 2007).

3.4. Les paramètres de la croissance démographique

Pour calculer l'efficacité potentielle de l'introduction d'un ennemi naturel dans un champ ou sous serre dans un programme de lutte biologique, il est nécessaire de connaître de façon approfondie les différents paramètres de fitness (survie, durée de développement, longévité, et capacités de reproduction) de chaque femelle dans les différentes conditions abiotiques de l'environnement où se produit le lâcher (Chi 1988; Yang & Chi 2006). La croissance de différentes populations a été étudiée en fonction de la température (Omer *et al.* 1996; Chen *et al.* 2008a; Chen *et al.* 2008b), des hôtes-plantes (van Impe & Hance 1993; Hance *et al.* 1994), des hôtes-insectes (Amir-Maafi & Chi 2006), et du milieu artificiel (Blanco *et al.* 2009). Généralement, ce sont les femelles qui sont prises en compte pour estimer les paramètres démographiques, car les mâles n'ont pas d'influence directe sur la croissance des populations. En conséquence, les effectifs totaux peuvent être calculés sur la base du sexe ratio de l'espèce (van Impe & Hance 1993). De façon générale, c'est le taux intrinsèque d'accroissement naturel (r_m) qui est considéré comme un critère d'évaluation de la croissance dans une population (Atlihan & Chi 2008; Chen *et al.* 2008a; Chen *et al.* 2008b; Latham & Mills 2010). Ce paramètre combine des informations sur le taux de fécondité net (R_0), la survie, et la durée de développement (T_c). Cependant, ce paramètre ne donne pas dans tous les cas la valeur exacte pour la croissance, parce qu'il se présente uniquement quand la croissance d'une population atteint un état stationnaire (Carey 1993; van Impe & Hance 1993). Pour cela, certaines études expliquent que c'est la production des descendants qui contribue le plus efficacement à déterminer la croissance d'une population (Gerin *et al.* 1994; Kennedy & Hance 1995). De plus, il est considéré que la fécondité cumulée est aussi un bon moyen de mesurer la croissance démographique (van Impe & Hance 1993).

La plupart des recherches effectuées sur le stockage au froid sont fondées sur la mesure du taux d'émergence, de la longévité, et de la fécondité. Cela représente une analyse incomplète pour évaluer la fitness d'un parasitoïde pour le lâcher après le stockage, faute des conclusions en terme de croissance démographique. Les seules études qui ont été réalisées l'ont été sur le parasitoïde *Gonatocerus ashmeadi* Girault (Hymenoptera : Mymaridae). Ce parasitoïde a été stocké aux stades immatures et aux stades adultes (Chen *et al.* 2008a; Chen *et al.* 2008b). Dans les deux cas, les résultats de ces recherches ont utilisé le r_m comme critère d'étude, et les auteurs ont montré que le stockage a entraîné une réduction de la fitness et du taux d'accroissement des générations maternelles.

Dans nos études, la différence entre les paramètres de la croissance démographique a été considérée avec l'objectif de trouver un paramètre qui permette de bien expliquer le taux de croissance après le stockage pour une génération.

4. Objectifs de la thèse

Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons aux parasitoïdes du genre *Aphidius*, pour déterminer quelles sont les meilleures conditions permettant un stockage au froid d'une durée maximale tout en ayant une production de parasitoïdes efficaces en lutte biologique.

L'objectif de cette thèse étant notamment de comparer différentes méthodes de stockage au froid afin de déterminer lesquelles sont les moins nocives pour les insectes ou les plus utiles pour les producteurs d'auxiliaires de lutte biologique, nous avons utilisé *A. ervi* comme modèle d'étude.

Après une présentation du matériel biologique, nous détaillerons les différentes études réalisées :

- Dans une première partie, notre objectif a été (i) d'étudier les conséquences d'une température de stockage au dessus du seuil de développement, pour deux durées d'exposition au froid et sur plusieurs paramètres de fitness : la survie, la longévité, la fécondité, et le succès d'accouplement des mâles, et (ii) de tester l'effet d'une exposition à des températures fluctuantes *versus* constantes sur la survie au froid des momies d'*A. ervi*. Nous avons également analysé la consommation des réserves énergétiques durant l'exposition au froid de ces momies. Cette étude a été menée dans des conditions de stress non intense (faible durée d'exposition et température de stockage relativement élevée) et elle a donc permis de mesurer les coûts physiologiques liés au stockage, en absence de mortalité. Chez la majorité des parasitoïdes, les individus ne peuvent pas synthétiser les lipides à l'âge adultes et donc ils ont des réserves lipidiques limitées. L'allocation de ces réserves vers un trait se fait alors au détriment de l'allocation vers un autre trait. Notre hypothèse est ici que les traits liés à la maintenance seront plus affectés que ceux liés à la reproduction. Cette allocation de lipides varie chez les mâles et les femelles. On suppose que les mâles vont être plus affectés que les femelles, car les femelles ont plus de réserves lipidiques que les mâles. On suppose également que les traitements fluctuants vont causer moins d'effets négatifs que les traitements constants.
- Dans la seconde partie, partant de l'hypothèse que les individus les plus grands sont plus intéressants pour la lutte biologique, nous avons comparé les effets du stockage

sur la relation fitness~taille des adultes après l'émergence chez *A. ervi*, en partant des deux hypothèses expliquant la consommation des réserves lipidiques. La première, « the Absolute Energy Demand 'AED' » prévoit que les petits individus survivraient mieux à un stress énergétique que les grands car ils ont moins de besoins énergétiques du fait de leur petite taille. La seconde « the Relative Efficiency 'RE' », prévoit au contraire que ce sont les grands individus qui survivraient mieux à un stress énergétique car ils auraient une meilleure efficacité dans l'utilisation de leur énergie. Les deux hypothèses seraient liées à une différence dans les taux de métabolisme relatifs des grands et des petits. Comme il y a un trade-off entre la reproduction et la maintenance, l'allocation de réserves lipidiques varie selon l'énergie consommée chez les grands et les petits individus. Chez les parasitoïdes, comme les mâles sont plus petits que les femelles, le stress au froid devrait donc être moins intense pour eux que pour les femelles.

- Dans la troisième partie, nous avons comparé l'effet du stockage sur le taux de croissance démographique afin d'évaluer, de manière comparative, l'évaluation démographique de *A. ervi* après différents traitements de stockage. Il s'agit ici non plus de comparer la fitness individuelle, mais le taux de croissance des populations après une génération de stockage, qui est un paramètre important pour les producteurs. Cette étude nous permettra de mieux comprendre la réponse d'un parasitoïde à l'exposition au froid dans les domaines fondamentaux et appliqués. Ici nous supposons que la température au dessus du seuil de développement sera moins néfaste que celles au dessous du seuil de développement. De plus le régime fluctuant devrait causer moins d'effets négatifs que le régime à températures constantes.
- Dans la dernière partie, nous avons analysé les effets d'une longue période de stockage sur quelques paramètres de fitness d'*A. ervi*, en partant de l'hypothèse que seul un stress suffisamment important pour causer un taux de mortalité fort pourrait représenter une pression de sélection suffisante à l'expression de phénotypes dits extrêmes, présentant des performances identiques à celles des témoins. Par contre, en cas de mortalité modérée, les individus présenteront des coûts physiologiques. Ici nous supposons que l'exposition à la plus basse température avec un régime constant sera le traitement le plus stressant, et que l'exposition à une température plus élevée avec un régime fluctuant sera le traitement le moins stressant.

Chapitre 2 : MODELE D'ETUDE

1. Les parasitoïdes

Introduction

Les parasitoïdes se sont adaptés à une très grande variété d'hôtes (Godfray 1994). Les femelles de parasitoïdes peuvent déposer leurs œufs à l'intérieur de l'hôte (il s'agit alors d'endo-parasitoïdes), ou à l'extérieur de l'hôte (on parle alors d'ecto-parasitoïdes). On différencie également les parasitoïdes *grégaire*s des *solitaire*s. Dans le cas des parasitoïdes grégaires, on trouve plusieurs individus se développant dans un même hôte, tandis qu'un seul individu se développe par hôte chez les parasitoïdes solitaires (Askew 1971; Godfray 1994).

La durée relative de l'interaction entre l'hôte et le parasitoïde est également importante et l'on distingue ainsi les espèces *idiobiontes* qui tuent et exploitent rapidement leurs hôtes, des espèces *koinobiontes* qui permettent à leur hôte de continuer plus ou moins normalement leur développement avant de succomber sous l'effet du développement parasitaire (Askew & Shaw 1986). Dans tous les cas, le cycle de vie des parasitoïdes est composé de quatre phases : l'œuf, la larve (plusieurs stades larvaires), la nymphe et l'adulte (Starý 1970a).

Les parasitoïdes s'attaquent à différents stades de leurs hôtes selon les espèces : les œufs (*Trichogrammatidae*), les larves (*Braconidae*), les pupes (*Tachinidae*) ; les adultes sont par contre rarement attaqués (par exemple, *Perilitus* sp) (Godfray 1994). Dans certains cas, le parasitisme peut avoir lieu lorsque l'hôte est au stade œuf mais avec un développement du parasitoïde suffisamment lent ou différé pour s'achever beaucoup plus tardivement lorsque l'hôte a atteint un stade larvaire (parasitoïdes ovo-larvaires) ce qui est le cas chez *Ascogaster quadridentat* Wesm (Hymenoptera : Braconidae), ou le stade pupa (parasitoïdes larves-pupes) comme c'est le cas chez *Neoplectops pomonella* Schnabl (Diptera : Tachnidae). Le nombre d'espèces susceptibles d'être infestées avec succès varie considérablement d'une espèce de parasitoïde à l'autre. Par exemple, certains Tachinides sont hautement généralistes (ou polyphages) et peuvent parasiter plusieurs dizaines d'espèces hôtes dans des familles différentes (Stireman & Singer 2003). De nombreuses espèces sont en revanche spécialisées sur une ou quelques espèces hôtes seulement (Stireman *et al.* 2006).

Le succès du parasitisme dépend d'une part de la capacité des femelles parasitoïdes à localiser leurs hôtes, et d'autre part de la capacité des larves de parasitoïdes à éviter la réponse immunitaire des hôtes (Hance *et al.* 2007).

2. Les espèces étudiées :

2.1. L'hôte

2.1.1. Données biologiques

Les pucerons sont des ravageurs qui sont surtout connus pour leur développement rapide (sexué, et asexué). Ils causent des dégâts directs aux plantes en prélevant leur sève, mais le problème le plus important est la transmission de virus aux plantes. Par exemple, les pucerons provoquent des dégâts importants sur les récoltes agricoles en Europe (perte de 700 000 tonnes environ de blé, de 850 000 tonnes environ de pommes de terre et 2 millions tonnes environ de betteraves) (Wellings *et al.* 1989).

Le puceron des épis *Sitobion avenae* Fabricius (Homoptère ; Aphididae) (Fig. 2) est présent avant l'épiaison puis grimpe sur l'épi dès son apparition (Outreman 2000). Ce puceron est une des trois principales espèces de pucerons ravageurs des céréales en Europe de l'Ouest. Sa couleur peut varier du vert au brun. Il se caractérise par des cornicules (tubes dorsaux en arrière de l'abdomen) foncés, ainsi que des pattes jaunes aux extrémités enfumées, et des antennes longues et noires.



Figure 2. Une plante affectée par le puceron *S. avenae* (Dewar Crop Protection Ltd)

Le puceron *S. avenae* effectue la totalité de son cycle annuel sur les graminées. Ce puceron se développe en se nourrissant sur des graminées sauvages (par exemple le dactyle) et cultivées (blé, orge, avoine), provoquant beaucoup de dégâts sur les plantes (une diminution du nombre de grains par épi et par conséquent une diminution sensible du rendement). En dehors de ces dégâts directs, ce puceron est considéré comme un ravageur très préjudiciable car il transmet le virus responsable de la Jaunisse nanisante de l'orge (*Barley yellow dwarf virus : BYDV*). De 2 à 100 plantes seraient infectées par un seul puceron (Dedryver *et al.* 2010). De plus, ils excrètent du miellat qui bloque les stomates et encourage

le développement des maladies fongiques. En conséquence, la photosynthèse sera réduite (Dixon 1987).

Les pucerons montrent une capacité de multiplication exceptionnelle. Ils présentent un cycle biologique particulier (Fig. 3) avec une alternance de phases de reproduction sexuée et asexuée (holocyclie) ou strictement parthénogénétique (anholocyclie) en fonction des conditions environnementales et des populations (Fig. 3).

Dans les régions tempérées de l'Ouest de la France, la phase sexuée ovipare a lieu à l'automne et aboutit à la production d'œufs fécondés résistants au froid, qui diapause pendant l'hiver et éclosent au printemps. Au printemps et en été, plusieurs générations parthénogénétiques vivipares se succèdent permettant une importante production de pucerons, et les femelles qui se dispersent permettent la colonisation de nouveaux plants de blé, sur lesquels elles déposent leur descendance (larves), formant ainsi des agrégats, ou colonies de pucerons. Ces formes parthénogénétiques sont sensibles aux basses températures hivernales.

Ce puceron, comme d'autres espèces, présente différents types de comportements de défense tels que les coups de patte, la fuite, la chute de la plante. Ils peuvent aussi produire des sécrétions corniculaires pouvant engluer le parasitoïde. Les cornicules peuvent également servir à produire des phéromones d'alarme. Lorsqu'un puceron est attaqué par un parasitoïde, il peut alerter les autres individus de la colonie qui est formée majoritairement d'individus apparentés (Kislow & Edwards 1972; Montgomery & Nault 1977; Mondor *et al.* 2000).

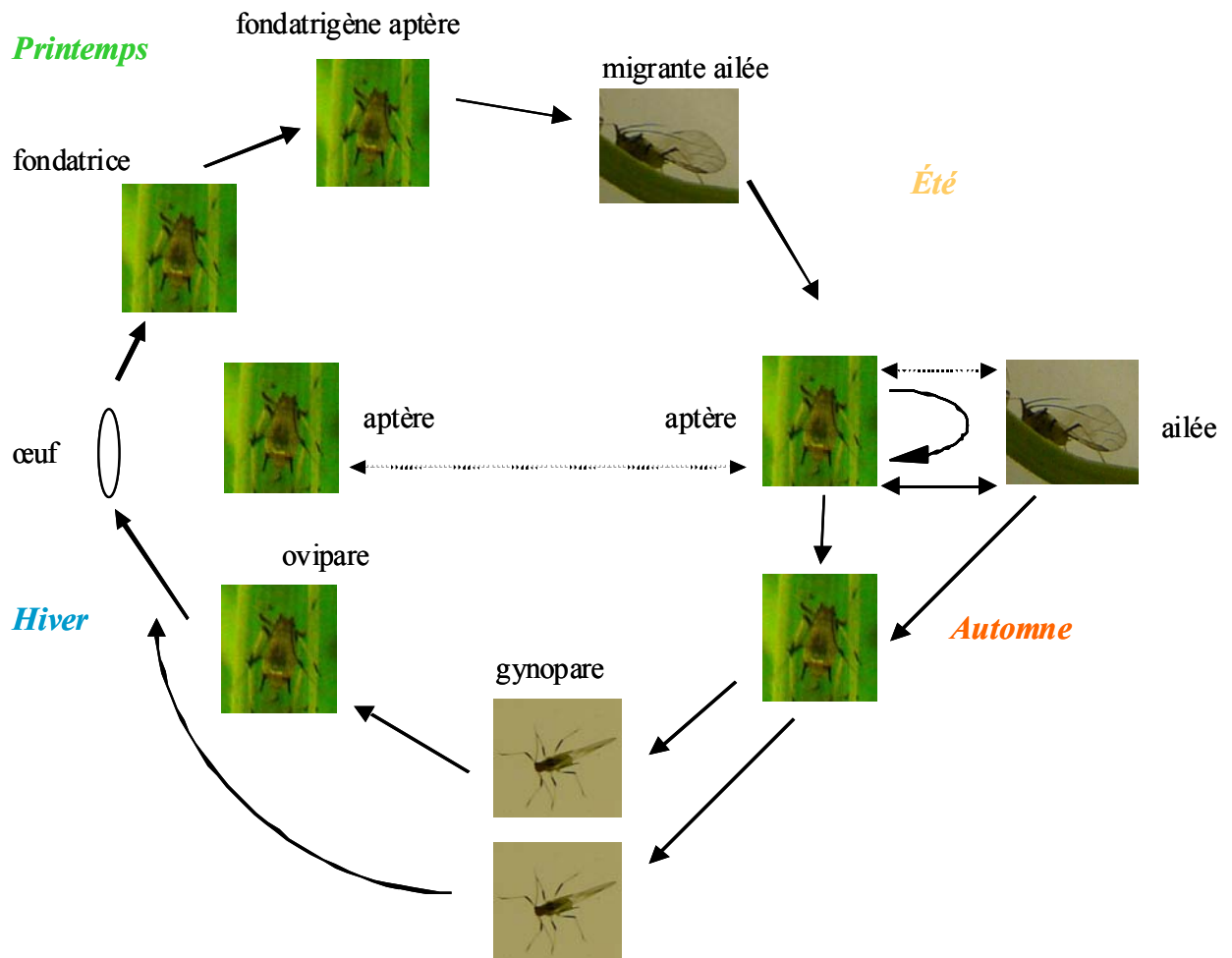


Figure 3. Cycle biologique du puceron des épis *S. avenae*. Ce schéma regroupe les cycles d'holocyclie (—>) et d'anholocyclie (----->) qui peuvent être observés chez ce puceron (Adapté de Outreman, 2000) (Photos d'après M. Ismail).

2.1.2. Élevage :

Les individus de l'élevage correspondent à des clones (SA1, collection INRA Zoologie) issus d'une femelle parthénogénétique collectée en 1990 sur une parcelle de blé au Rheu (Ille & Vilaine, 35). Ils sont élevés en salle climatisée ($20\pm 1^\circ\text{C}$, HR $70\pm 10\%$, 16L : 8D) dans des cages en plexiglas ($50 \times 50 \times 50$ cm) disposant de trois aérations en tulle fin et en polyamide, sur du blé tendre d'hiver (*Triticum aestivum*, variété Boston, fourni par la société Saaten Union Recherche) semé sur un support inerte, la vermiculite (Fig. 4).



Figure 4. Des cages en plexiglas contenant de pots de blé infestés par des pucerons *S. avenae* (Photos d'après M. Ismail).

2.2. Les parasitoïdes du genre *Aphidius*

2.2.1. Introduction

Les travaux de cette thèse vont porter sur les parasitoïdes du genre *Aphidius*, de la famille de (Braconidae : Aphidiinae). Cette famille comprend 52 genres et 400 espèces, toutes spécialisées dans le parasitisme des pucerons (Hagvar & Hofsvang 1991). Les Aphidiinae sont des endoparasitoïdes, koïnobiontes et solitaires. Plusieurs espèces d'Aphidiinae sont actuellement employées comme agents de lutte biologique contre des pucerons (Cock *et al.* 2010; van Lenteren 2003a).

De plus, ce sont des parasitoïdes à parthénogenèse arrhénotoque, c'est-à-dire que les œufs qui sont pondus par des femelles non fécondées donnent des mâles (haploïdes), alors que les œufs pondus par des femelles fécondées donnent des femelles (diploïdes) et des mâles (haploïdes). Ces espèces sont plutôt synovogéniques car, si elles émergent avec un stock d'œufs matures, elles peuvent continuer à produire et maturer des œufs durant leur vie adulte (Starý 1970a; Le Ralec 1991). Les espèces les plus étudiées sont : *A. colemani*, *A. ervi*, *A. rhopalosiphii* (Levie 2002; Muratori *et al.* 2004; Colinet 2007; Le Lann 2009).

2.2.2. Le cycle biologique

Les femelles d'*Aphidius* (accouplées ou vierges) pondent dans tous les stades larvaires des pucerons. La plupart des espèces d'*Aphidius* préfèrent les pucerons qui sont de petite ou moyenne taille (Shirota *et al.* 1983; Lin & Ives 2003; He *et al.* 2004). Il est probable que la baisse du taux de parasitisme dans les stades plus âgés soit due à une défense plus efficace de ceux-ci contre le parasitoïde (Rohne 2002).

L'œuf éclot et la larve de parasitoïde consomme progressivement le contenu du puceron qui poursuit son développement jusqu'au dernier stade larvaire du parasitoïde. Il y a trois stades larvaires pour le genre *Aphidius* (O'Donnell 1987; Pennacchio & Digilio 1990; Muratori *et al.* 2004). A la fin du développement larvaire, la larve tisse un cocon à l'intérieur du puceron. A ce stade, l'enveloppe de puceron contenant un parasitoïde au stade nymphal qui prend le nom de momie et qui sera collée à la surface de la feuille (Starý 1970a). A 20°C, le stade nymphal commence au cours du 10^{ème} jour après la ponte, et dure 3-4 jours environ. Puis, les adultes commencent à sortir après avoir pratiqué une ouverture dorsale à l'aide de leurs mandibules (Fig. 5).

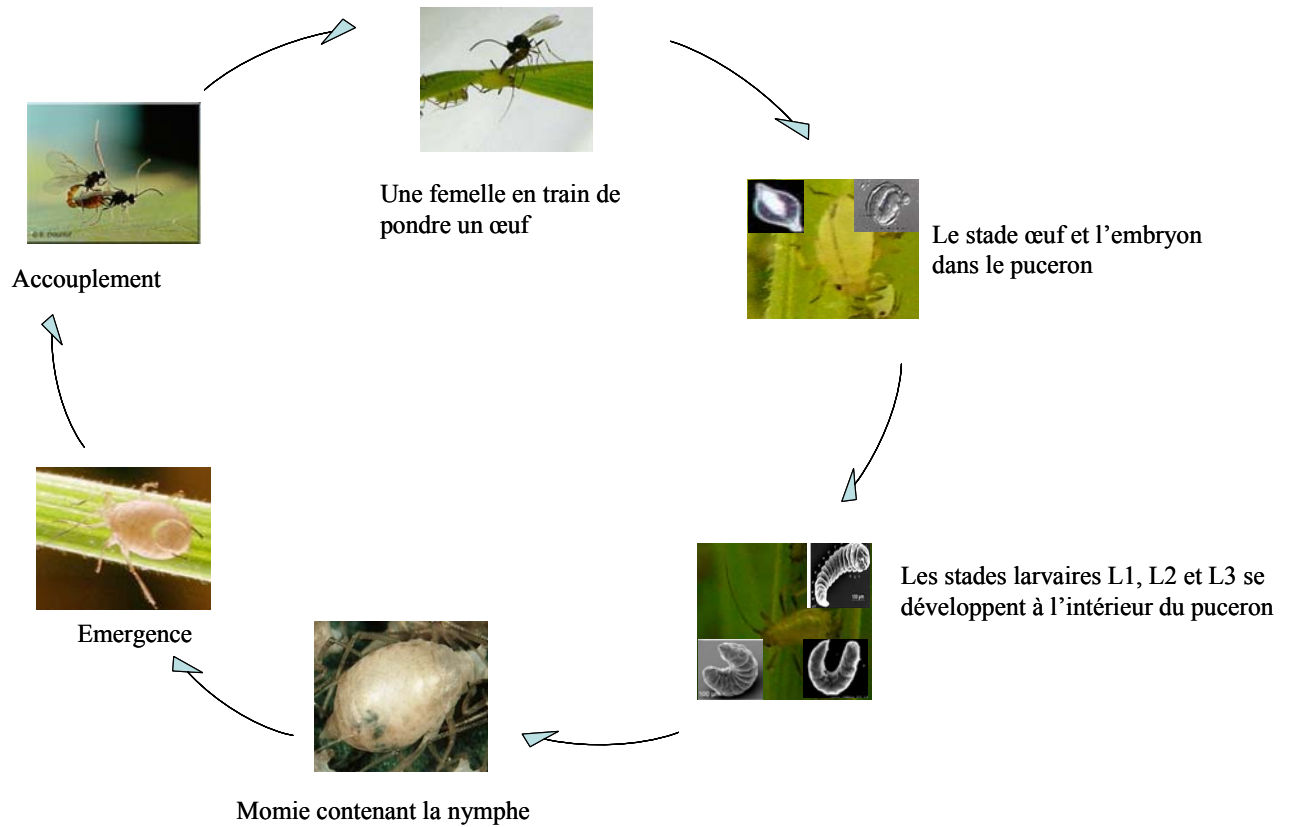


Figure 5. Cycle de vie d'un parasitoïde du genre *Aphidius* (adapté de Outreman, 2000 ; les photos des larves proviennent de la publication de Muratori *et al.*, 2004 ; la photo d'accouplement a été réalisée par Sonia Dourlot ; la photo de ponte par M. Ismail).

2.2.3. Les effets du stockage au froid chez *Aphidius*

Il est difficile de point de vue pratique de stocker les pucerons parasités au froid. De même, le stockage des adultes n'est pas pratiqué pour des raisons techniques, et il a été signalé que les adultes tolèrent moins bien le froid que les stades immatures (Starý 1970b; van Lenteren & Tommasini 2003). Donc dans toutes les études sur le stockage des *Aphidius*, c'est le stade de la momie âgée d'un jour (les plus tolérantes à l'exposition au froid) qui est utilisé (Starý 1970b; Whitaker-Deerberg *et al.* 1994; Levie *et al.* 2005b).

Plusieurs études, résumées dans le tableau 2 ont été menées sur le stockage au froid chez des espèces du genre *Aphidius* pour évaluer les paramètres de fitness affectés. Aucune de ces études n'a estimé les paramètres de croissance démographique.

2.3. *Aphidius ervi*

Nous étudierons particulièrement l'espèce *A. ervi*, qui est commercialisée par 3 producteurs en Europe. Par exemple, la société Viradaxis en Belgique vend plus de 5 millions d'individus *A. ervi* par an, ce qui nécessite de les stocker. Cette société stocke les individus actuellement à 7.2°C pour 1 semaine et ils sont ensuite vendus aux distributeurs qui à leur tour les stockent pour 1 ou 2 semaines à température inférieure.

Pour avoir une bonne qualité des émergents chez *A. ervi*, les parasitoïdes devraient avoir les critères suivants (van Lenteren 2003a) : $\geq 75\%$ de taux d'émergence, $\geq 45\%$ de females produites dans les descendants, ≥ 35 momies par femelle en 2 h, $\leq 8\%$ mortalité des individus présents sur un patch de pucerons.

2.3.1. La distribution géographique

Aphidius ervi existe naturellement dans une grande partie de l'Europe, et il a été introduit en Amérique du Nord, Argentine, Nouvelle-Zélande et Australie.

2.3.2. La morphologie

La couleur du corps de cette espèce est noir-brillant, la forme est effilée, avec des pattes brunes et de longues antennes, la couleur du pétiole est noire, sa forme bosselée. Le nombre d'articles antennaire est de 20-21 pour le mâle, et de 18-19 pour la femelle (Starý 1973).

2.3.3. Le spectre d'hôtes

Aphidius ervi attaque une large gamme d'espèces hôtes : *Metopolophium dirhodum*, *Schizaphis graminum*, *Sitobion avenae*, *S. fragariae*, *Acyrtosiphon pisum*, *Myzus persicae*,

Macrosiphum euphorbiae, et *Aulacorthum solani*. Il a également une grande fécondité et chaque femelle pond environ 300 œufs pendant sa vie (He *et al.* 2006), dont la plupart sont pondus pendant les premiers jours (Stilmant 1994).

2.3.4. Elevage

La souche d'*A. ervi* provient d'un élevage massif d'auxiliaires (Viridaxis, Belgique), où il a été élevé sur le puceron *S. avenae*. Dans notre laboratoire, *A. ervi* a été élevé aussi sur *S. avenae* dans des cages en plexiglas (50 × 50 × 50 cm) disposant de trois aérations en tulle fin et en polyamide, et placées en salle climatisée (20±1°C, HR 70±10%, 16L : 8D). Cette salle est séparée de la salle de pucerons. Pour maintenir l'élevage, des pots de blé infestés de pucerons sont transférés trois fois par semaine, avec des gouttelettes de miel.

Tableau 2. Les conséquences négatives du stockage au froid chez différentes espèces de parasitoïdes du genre *Aphidius*.

Paramètres de fitness	Espèce de parasitoïde	Température de stockage (°C)	Référence
Survie	<i>Aphidius matricariae</i>	8	Shalaby & Rabasse, (1979)
	<i>A. colemani</i>	0, 4 et 7	Hofsvng & Hagvar, (1977)
	<i>A. rhopalosiphi</i>	-5	Levie <i>et al.</i> (2005)
	<i>A. colemani</i>	2 et 4	Colinet <i>et al.</i> (2006 b)
	<i>A. picipes</i>	4	Amice <i>et al.</i> (2008)
	<i>A. ervi</i> ; <i>A. matricariae</i>	2	Colinet et Hance (2010)
Longévité	<i>A. picipes</i>	4	Amice <i>et al.</i> (2008)
	<i>A. colemani</i>	2 et 4	Colinet <i>et al.</i> (2006 a)
Fecundité	<i>A. rhopalosiphi</i>	-5	Levie <i>et al.</i> (2005)
	<i>A. matricariae</i>	1,2	Polgar (1986)
Sterilité des mâles	<i>A. rhopalosiphi</i>	-5	Levie <i>et al.</i> (2005)
	<i>A. colemani</i>	4	Colinet et Hance (2009)
Sexe ratio	<i>A. colemani</i>	2 et 4	Colinet <i>et al.</i> (2006 b)
Anomalie d'antennes	<i>A. rhopalosiphi</i>	4	Bourdais <i>et al.</i> (2006)
	<i>A. picipes</i>	4	Amice <i>et al.</i> (2008)
Mobilité	<i>A. colemani</i>	4	Colinet & Hance (2009)
Succès d'accouplement	<i>A. picipes</i>	4	Amice <i>et al.</i> (2008)
	<i>A. colemani</i>	4	Colinet & Hance (2009)

Chapitre 3

Physiological Costs of Cold Exposure on the Parasitoid *Aphidius ervi*, without selection pressure and under constant or fluctuating temperatures.

Mohannad Ismail, Philippe Vernon, Thierry Hance, and Joan van Baaren

Biocontrol (2010) 55, 729–740

Résumé

L'objectif de cette étude est de mesurer les conséquences d'un stress de faible intensité pour évaluer les coûts physiologiques induits par le stockage au froid. Nous avons effectué cette étude sur le parasitoïde *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Aphiniinae) en utilisant une durée de stockage n'induisant pas de mortalité. Nous avons exposé des momies âgées de 24h à 5 traitements différents: le témoin à 20 °C, une exposition de 1 et de 2 semaines à 7°C, à un régime thermique constant et à un régime thermique fluctuant (7°C pendant 22h et 20°C pendant 2 heures). Deux traits de fitness ont été particulièrement affectés après 2 semaines à 7°C constant : la longévité des femelles, et le sex-ratio de la descendance qui a montré une augmentation de la proportion de mâles produits. En revanche, la charge en œuf à l'émergence, la fécondité réalisée, le taux d'asymétrie chez les individus des deux sexes, et le succès des accouplements n'ont pas été significativement affectés dans tous les traitements. Les effets de ces traitements sur l'utilisation des réserves lipidiques et la fertilité des mâles et des femelles sont discutés.

Mots-clés : *Aphidius ervi*, coûts physiologiques, stockage au froid, teneur en lipide, teneur en eau.

Abstract

The aim of this study is to evaluate the physiological costs and the consequences on fitness of cold exposure on the parasitoid *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Aphidiinae) under non-lethal conditions. We exposed 1-day-old mummies to different treatments: control at 20°C, 7°C constant, 7°C fluctuating (7°C for 22h and 20°C for 2h). Two performances of fitness were particularly affected after 2 weeks at 7°C constant: female longevity, and the sex ratio of the progeny was male biased. In contrast, egg load at emergence, life time fecundity, frequency of asymmetric individuals in both sexes, and mating success were not significantly affected under all treatments. The effects of these treatments on trends such as utilisation of fat reserves and fertility of males and females are discussed.

Keywords: *Aphidius ervi*, cold storage, fitness, physiological costs, fat content, water content.

Introduction

Cold exposure affects the survival of exposed individuals and subsequently the performance of the survivors. Survival rates of exposed individuals decrease with decreasing temperatures and increasing exposure duration (Legner 1976; Okine et al. 1996; López and Botto 2005; Rundle et al. 2004). However, measuring the fitness of surviving individuals represents a bias, as individuals that die are supposedly the most affected by cold stress because of their low phenotypic plasticity or genetic background. Conversely, surviving individuals are possibly the best adapted or those that present the widest phenotypic plasticity (Pompanon and Boulétreau 1997; Leopold 1998; Amice et al. 2008). Consequently, the means of several traits measured on surviving individuals could be skewed.

Cold storage is a case of cold exposure used in biological control, with the aim of providing an opportunity to produce simultaneously a large amount of natural enemies, available when they are necessary. Indeed, insect pests abundance in the field varies quickly, and can increase abruptly. Although cold storage has been studied for many years, its use is still limited because low temperatures affect the survival and different life-history traits of surviving adults. Several authors have pointed out the negative effects, such as high rate of mortality (Legner 1976; López and Botto 2005; Levie et al. 2005), and negative effects on different life history traits such as longevity (Jalali and Singh 1992; Colinet et al. 2006a; Ayvaz et al. 2008; Amice et al. 2008), fecundity and sex ratios (Pitcher et al. 2002; Levie et al. 2005; Bayram et al. 2005), antenna asymmetry rate (Bourdais et al. 2006), female and male sterility (Hanna 1935; Levie et al. 2005), and flight ability, which affects dispersal (Luczynski et al. 2007; Couillien and Gregoire 1994).

Several attempts have been made to limit the negative impacts of cold storage. First, it was shown that the capacity to survive cold storage varies between and within species of natural enemies (Leopold 1998; Eilenberg et al. 2001). For example, Kumar et al. (2005) reported that *Trichogramma brasiliensis* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) can be stored at the pupal instar in the eggs of the host for 10 days at 4°C, while *T. chilonis* and *T. pretiosum* can be stored for 20 days at the same temperature. Secondly, several studies showed that instar tolerance to cold storage varies between species (egg, larva, pupa, and adult) (Pitcher et al. 2002; Levie et al. 2005; Häckermann et al. 2008; Chen et al. 2008). Thirdly, it was shown that to improve the conditions of cold storage, pre-storage acclimation has a positive effect on survival (Kajita 1967; Bueno and van Cleave 1997; Rigaux et al. 2000; Levie et al. 2005; Coudron et al. 2007). Recent studies have pointed out that the use of fluctuating temperatures

during storage improves the emergence rate, i.e. a cold period interrupted by a return to a higher temperature for a short time (Leopold et al. 1998). Particularly, Rudolf et al. (1993) demonstrated that a fluctuating temperature regime increased the emergence rate of two species of *Orius* (Heteroptera: Anthocoridae). Similar results were obtained by Colinet et al. (2006b) mixing acclimation and fluctuating temperatures.

To measure the physiological costs induced by cold storage, selection should be excluded by applying a stress level which does not impact mortality (Amice et al. 2008). In this study, we used sublethal (i.e. which does not induce mortality) low temperatures to verify which are the life-history traits affected by cold storage and their consequences on fitness. As far as we know presently, no study has attempted to measure true physiological costs without the influence of genetic selection. We measured different life-history traits after different cold storage treatments in the parasitoid *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Aphidiinae).

We sought to test four hypotheses: (1) Fluctuating treatments will produce less effects on fitness than constant ones. (2) Males and females will undergo changes on different life-history traits, as several studies on cold or heat temperature exposures showed that males are differently affected than females (Amice et al. 2008; Roux et al. in press). (3) Cold exposure was already shown to have negative effects on male reproductive success (Hanna 1935) and on male longevity (Colinet et al. 2006a). As no data have been published for trade-off between longevity and male fertility, we will test which trait will be the first affected. (4) As parasitoids are unable to synthesize lipids (Visser and Ellers 2008), and are thus energy limited, a trade off between longevity and fecundity was shown in females of several species (Ellers 1996; Ramesh and Manickavasagam 2003; Michaud and Qureshi 2006). In *Aphidius* species, most of the eggs are laid in the first days of life (Stilmant 1994). For this reason, we expect that females will allocate most of their energy to fecundity at the expense of their longevity.

Materials and methods

Biological model

We chose the parasitoid *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Aphidiinae) as a model as it is commercially produced and widely distributed in several European countries for mass release (Starý et al. 1988). It is a common cosmopolitan solitary endo-parasitoid (March 1977) of several aphid species of economically important crops such as legumes and cereals (Starý 1978, Stilmant et al. 2008). A large sampling (more than 300 mummies) of *A. ervi* was provided in January 2007 by Viridaxis S.A. in Belgium where it was reared on the grain aphid

Sitobion avenae F (Homoptera: Aphididae). This company regularly renewed their rearing. In our laboratory, it was reared on a SA1 clone (INRA collection) of the same host species, which was collected from the wheat crops around Rennes in France in 1990. The aphids were reared in laboratory conditions in small pots of wheat (*Triticum aestivum* L, cv. Boston). Parasitoids and hosts were maintained in Plexiglas cages (50 × 50 × 50 cm) in climate rooms at 20 ± 1°C, 60 ± 10% RH with a photoperiod 16L: 8D. *Aphidius ervi* was reared for three generations before the experiments. A new sample was added one year later to refresh the culture.

Experimental design

Aphid parasitoids stop feeding when the larva spins its cocoon inside the empty cuticle of the aphid forming a “mummy” and pupates (Hagvar and Hofsvang 1991). One-day-old mummies are considered more suitable instar for storage in aphid parasitoids (Starý 1978; Archer et al. 1973; Whitaker-Deerberg et al. 1994; Levie et al. 2005).

Short storage durations (1 and 2 weeks) were chosen because the mortality rate increases with storage duration (Rundle et al. 2004). The storage temperature was chosen slightly above the mummy-adult development threshold (7°C), which is $T_0 = 6.6^\circ\text{C}$ for *A. ervi* (Sigsgaard 2000), because the mortality rate increases with the decrease of temperature (López and Botto 2005). 1500 one-day-old mummies of *A. ervi* were randomly assigned to each of the five following thermal treatments:

Treatment T: control at 20°C.

Treatment C1: constant temperature at 7°C for 1 week.

Treatment C2: constant temperature at 7°C for 2 weeks.

Treatment F1: fluctuating temperature at 7°C for 1 week, interrupted 2 hours daily to 20°C as described by Colinet et al. (2006b).

Treatment F2: fluctuating temperature at 7°C for 2 weeks, interrupted 2 hours daily to 20°C.

For all treatments, mummies were acclimated by exposing them progressively from 20°C to 7°C (with 2h hours at 17, 14 and 11°C) as described by Levie et al. (2005). They were then kept in a thermo-regulated Sanyo incubator (Electric Co. Ltd, Japan) with a thermal precision of ± 1°C, under a photoperiod 16L: 8D. After cold storage, mummies were progressively transferred from 7°C to 20°C, with 2h at (11, 14 and 17°C). To avoid the effect of incubators, the incubators used for each treatment were regularly permuted. For all treatments, emerging adults were tested for the following fitness components at 20°C:

emergence rate, time lapse before emergence, longevity, morphology, mating success, number of mature eggs, lifetime fecundity, and physiological parameters.

Emergence rate

The emergence rate was measured by placing 300 mummies per treatment individually in a small gelatine capsules ($\varnothing = 0.5$ cm, $L = 1.5$ cm). Adult emergence rate was expressed as the number of individuals which emerged from these 300 mummies. Mummies in which adults failed to emerge were dissected to determine parasitoid instar stage.

Time lapse before emergence

Time lapse was calculated from the end of treatment (mummy stage) to adult emergence. For the control treatment T, it was calculated from one-day-old mummy to the day of their emergence. Emergences were checked once daily, at the same time. Based on $T_0 = 6.6^\circ\text{C}$, the parasitoids inside the mummies would accumulate about 0.4 DD per day during cold exposure, whereas at 20°C , they would accumulate about 13.4 DD each day. To calculate the temperature accumulation for the parasitoids, we used the following equation: temperature accumulation = $A * B$ with A = the difference between the temperature and the T_0 , and B = Days under cold storage or at ambient temperature.

Longevity

30 males and 30 females were individually put into small tubes (1.5 cm diameter and 10 cm long), and they were provided with water and honey during their life. The lifespan in days was measured by observing them daily at the same time until death.

Morphology

To show the effect of cold storage on the morphology of emerging individuals, we measured two parameters. First, frequencies of asymmetric individuals: we considered that an individual is asymmetric in its antenna when the number of segments is different for the two antennae. The antennomeres of the antennae of 30 males and 30 females per treatment were counted. Secondly, the two hind tibiae of each individual were measured with the numeric image analysis software Pegasus Pro V4 under a binocular ($\times 3.15$, Olympus SZCTV) linked to a video camera (JVC KY-F50). This measure is considered as a good indicator of the total adult size. The mean of the two measures was taken. Tibia length is the most common indicator of body size in parasitoid wasps (Pavlik 1993; Godfray 1994).

Mating Success

The consequence of cold exposure on success of mating behaviour was quantified by placing 25 one-day-old females from each treatment individually with one male from the same treatment in a small tube. We observed the behaviour from the first contact between the pair to the end of copulation. When copulation did not occur within 10 minutes, the male was replaced by another one (3 males maximum for each female. Otherwise, no mating occurred). We measured the duration of different mating phases: d1: latency to first contact, d2: time of the beginning of mounting, d3: mounting duration, d4: copulation duration.

Number of mature eggs

Thirty females less than 2h old were dissected in a drop of water on a microscope slide under a microscope (x4, Olympus BH2), in order to count the number of mature eggs in the ovaria at emergence. Mature eggs were distinguished from non-mature eggs because they were completely formed (Le Ralec 1991).

Lifetime fecundity

To test the reproductive capacities of the females after cold storage, one-day-old females mated with a male from the same treatment were transferred to a small pot containing a wheat plant with about 100 aphids of 3rd and 4th larval instar. To be sure that females were never limited in the number of hosts, and as females usually lay their eggs at the beginning of their life, these pots were renewed every day during five days and then 1 time every 3 days until the death of the female. The females were also provided with honey *ad libitum*. This experiment was carried out under $20 \pm 1^\circ\text{C}$ with a 16L: 8D photoperiod. Moreover, the mortality of these females was checked daily from the first day of the experiment to their deaths. Lifetime fecundity was evaluated by counting the number of mummies obtained. These mummies were placed in a plastic Petri dish until emergence to determine the sex ratio of the progeny.

Physiological parameters

1- Mummies: For each treatment, 30 mummies were used for individual mass measurement (micro-electrobalance sensitivity 0.1 mg, Sartorius, Germany). Fresh mass was measured just *before* (FM*b*) and *after* (FM*a*) cold exposure. Mass loss (ML) occurring during cold exposure on the mummies corresponds to the difference and was expressed as a

percentage of initial mass ($ML = \left\{ \frac{FMb - FMa}{FMb} \right\} * 100$). There was no ML for the control. Dry mass (DM) was obtained after exposing the mummies to 60°C for 3 days in an air oven. Water mass (WM) was obtained as $WM = FMa - DM$. Then water content (WC) was calculated as a ratio $WC = WM/DM$ (Kostal et al. 2004). To evaluate the lipid consumption, each dried mummy was placed for 2 weeks in an Eppendorf tube containing 1 ml of the extracting solution chloroform/methanol (2:1) (Vernon and Vannier 1996; Terblanche et al. 2004). Then the mummies were dried for 12 h in an air oven at 60°C to remove the extracting solution to measure lean dry mass (LDM). Body fat mass (FM) was obtained by subtracting LDM from DM, and fat content (FC) was calculated as a proportion ($FC = FM/LDM$).

2- Adults: to estimate if the cold storage affects emerging adults, the same parameters (FM, DM, WC, LDM and FC) were measured for 20 emerging males and females using the same experimental design.

Statistical analyses

Statistical analyses were done using the statistical package R version 2.8.0 (R Development Core Team, 2008). First, the homogeneity of the individuals was verified among the different treatments by measuring the hind tibia. Emergence rates (i.e., proportions of adults that successfully emerge), and the frequency of antenna asymmetry were compared among treatments using χ^2 tests.

The time lapse needed before emerging for different durations of cold exposure was analysed by Generalized Linear models based on a Poisson distribution and log-link function (Crawley 1993). Longevity was compared for males and females separately by using the Cox Proportional Hazard Model, followed by Bonferroni's post hoc multiple comparison tests when treatments were significantly different ($\alpha = 0.05/k$, where k is the comparisons number).

Females mating success was compared separately among the four categories (first male, second male, third male, and no mating) by using χ^2 tests. We used the Kruskal-Wallis tests to compare the duration of the different mating phases.

For the two parameters of fecundity and the sex ratio of G1, a one-way Anova test was applied. For the time lapse and the sex ratio, Tukey's honest significant difference test ($\alpha = 0.05$) was used for pairwise comparisons. The physiological parameters were compared by Kruskal-Wallis tests, followed by Bonferroni's post hoc multiple comparison tests when the treatments were significantly different ($\alpha = 0.05/k$). All the tests were carried out with the

thermal treatment as the main factor. Data are presented as mean \pm SE $\{se = \text{standard deviation}/\sqrt{n}\}$, and as percentage \pm SE $\{se = \sqrt{(pq/n)}\}$.

Results

Emergence rate

The emergence rate of *A. ervi* did not decline with storage duration and was similar to the control ($\chi^2 = 0.22$; $df = 4$; $p = 0.996$). All treatments showed a high emergence rate (T = 97.73 ± 1.03 , C1 = 95.12 ± 1.24 , C2 = 94.16 ± 1.35 , F1 = 97.45 ± 0.91 , and F2 = 96.36 ± 1.08 %). This result affirms that under the experimental conditions, *A. ervi* mummies did not undergo a selection process. The dissection of non emerged mummies showed that individuals died as imago before emergence, thus after metamorphosis.

Time lapse before emergence

The time required to develop into adults once brought back to 20°C after cold storage varied significantly among the treatments ($\chi^2 = 4.41$; $df = 4$; $p = 0.04$). It decreased gradually as the length of cold exposure increased (Fig. 1), which is expected since storage temperature was above T_0 . Larvae continued to develop slowly at 7°C. In constant treatments, larvae accumulated about 2.8 DD in C1 and about 5.6 DD in C2, whereas in the fluctuating treatments, larvae accumulated about 3.04 DD in F1 and about 6.62 DD in F2.

Longevity

Male longevity was not significantly affected by storage among the different treatments, whereas female longevity significantly decreased under the treatment C2 (Table 1).

Morphology

The frequency of asymmetric individuals did not vary significantly between males and females ($\chi^2 = 4.45$; $df = 1$; $p = 0.35$). Moreover, the rate of asymmetric antennae did not increase significantly under the treatments for males and females (Appendix 1).

The size of emerging individuals of both sexes did not decrease after the storage. The length of tibia presented an equal size for all treatments (Male, Anova, $F = 0.782$; $df = 4, 145$; $p = 0.563$), (Female, Anova, $F = 2.156$; $df = 4, 145$; $p = 0.1$).

Mating success

The number of females accepting the male from the first time was not significantly different among the storage treatments comparing to the control (Appendix 2). Furthermore, the duration of all mating phases did not vary significantly among the treatments (Appendix 3).

Number of mature eggs

The mean number of mature eggs at emergence ($T = 77.83 \pm 5.59$, $C1 = 68.50 \pm 5.47$, $C2 = 71.33 \pm 4.92$, $F1 = 77.53 \pm 6.32$, and $F2 = 73.10 \pm 5.26$) did not vary significantly among the treatments (Anova, $F = 0.529$; $df = 4, 145$; $p = 0.714$).

Lifetime fecundity

No significant difference was found in the lifetime fecundity among the treatments (Anova, $F = 0.74$; $df = 4, 64$; $p = 0.57$; $T_{15\text{ females}} = 72.67 \pm 7.18$, $C1_{13\text{ females}} = 63.46 \pm 5.93$, $C2_{13\text{ females}} = 60.46 \pm 3.90$, $F1_{15\text{ females}} = 70.60 \pm 7.11$, and $F2_{13\text{ females}} = 62.62 \pm 6.12$).

The emergence rate from mummies obtained in the first generation (G1) from the females for each treatment did not vary among the treatments ($\chi^2 = 0.12$; $df = 4$; $p = 0.998$; $T = 95.29 \pm 0.69$, $C1 = 95.26 \pm 1.06$, $C2 = 95.36 \pm 1.17$, $F1 = 95.31 \pm 1.31$, $F2 = 94.83 \pm 0.79$).

Sex ratio of G1 was significantly reduced in the treatment C2 (Anova, $F = 2.67$; $df = 4, 64$; $p = 0.039$) (Fig. 2). Among all females tested, one female in the treatment C2 produced only males.

Physiological parameters

Table 2 presents all of the changes in the physiological measures for mummies and adults. We found a significant reduction in the value of all parameters (DM, WM, WC, LDM, FM, and FC) in the case of mummies. In contrast, all these parameters did not vary significantly among the treatments in the case of emerging adults (males and females).

Discussion

Physiological costs

The physiological costs of cold exposure at the population level are often underestimated as they are currently mixed with a selection pressure which kills some of the individuals most susceptible to temperature (Amice et al. 2008). As we observed no mortality after 2 weeks at 7°C, we did not select individuals that resist better to temperature.

We tested 4 hypotheses. (1) Fluctuating treatments will produce less effect on fitness than constant ones. We observed that the performance of *A. ervi* clearly varied according to treatments (Table 3). The fluctuating treatment induced less damage than the constant ones. The pupae inside the mummies in the constant and fluctuating treatments suffered from a significant decrease in water content. Pupae under the constant treatments suffered from a reduction in fat content. It was already shown (Colinet et al. 2006b) that fluctuating temperatures improved the performances that are affected under storage at constant treatments. It was hypothesized that during a period of return to ambient temperature, a physiological recovery is possible under a fluctuating system (Colinet et al. 2006b), and this period would repair the accumulation of toxic products caused by storage (Leopold et al. 1998).

(2) Males and females will undergo different life-history trait changes. For females, longevity was the only trait affected by cold storage, whereas for males, longevity was not affected. In other studies, the effect of cold exposure was shown to be more detrimental to males than females for several parameters. Colinet et al. (2006b) demonstrated that the male survival rate after mummy cold exposure was lower than for females in *Aphidius colemani*. They explained that females have higher amounts of energy reserves, so males during pupae instar exhaust their energy stock more rapidly than females. Generally, under low temperatures, insects do not feed and maintain a low level of metabolism, and so energy reserves can be critically affected (Renault et al. 2002). Amice et al. (2008) also indicated that only males showed fluctuating asymmetry in the number of antennomeres in *A. picipes*. Haplodiploidy might be an important factor explaining differences in resistance between males and females (Colinet and Hance, 2009). Indeed, females with their double set of chromosomes could be less sensitive to stress-induced damage to DNA, and diploid cells can repair damage through recombination (Roux et al. in press). However, in our results, it was not expressed by a difference in sensitivity to fluctuating asymmetry in antennae.

As no study really measured the total costs in fitness for both sexes, it is difficult to draw a general conclusion about the most susceptible sex to cold storage. In our study, female life-time fecundity did not seem to be affected, but with the diminution of female proportion in G1, we might suppose that males were affected more than females.

(3) Cold exposure was already shown to have negative effects on male reproductive success (Hanna 1935) and on male longevity (Colinet et al. 2006a). We observed a decrease in the female progeny sex ratio. This increase in the proportion of males in the offspring of C2 could be due to the quantity or the quality (more dead than live ones) of male sperm. This was

already observed for *Dinarmus basalis* after cold shock for 1 h at -18°C (Lacoume et al. 2007), but no study has been done on the effect after cold storage without mortality. So we could suppose that there was a trade-off between males longevity and their fertility. Males did not seem to use their reserves during storage in the same way, as male longevity was not reduced after immature cold exposure. So we supposed that producing sperm in males needs less energy than forming and maturing eggs in females.

(4) We expected that females would conserve most of their energy for their fecundity, at the expense of their longevity, due to the trade-off longevity-fecundity (Ellers 1996; Ramesh and Manickavasagam 2003; Michaud and Qureshi 2006). In our case, only longevity was affected for females. It is possible that females used some of their reserves for gametogenesis before emergence (Ellers and van Alphen 1997), and so consumed more reserves than males. In our hypothesis, the females preferentially invested a part of their fat reserves in fecundity that could have been invested in longevity to resist the effects of cold storage. This has a positive effect on fitness, while we have shown that the life-time fecundity of females was not affected, and a reduction of longevity without oviposition has a weak effect on female fitness.

After mummy cold exposure, physiological costs were only recorded for female longevity without oviposition, and sex ratio of the progeny. We observed that egg load, life time fecundity and longevity in presence of hosts, frequency of asymmetric individuals, and mating success were not affected by storage treatments compared to the control. In some studies where no significant mortality was observed after cold exposure, it was shown that longevity is affected. For example, Ayvaz et al. (2008) found a decline in longevity and mobility capacity in *Trichogramma evanescens* after storage for 2 weeks at 4°C . Sometimes, no physiological costs seemed to be observed at all: for instance, Chen et al. (2008) showed that longevity and fecundity for adults of *Gonattocerus ashmeadi* after immature storage for 20 days using cycling temperature at (4.5, 6.0, and 7.5°C) performed as well as control individuals. However, in all these cases, only a few parameters were measured compared to our study. Concerning the other parameters that were not affected in our study, i.e. frequency of asymmetric individuals or mating success, no other studies measured these parameters in conditions without mortality. Moreover, the duration of premating and total mating success were not affected by cold storage compared to the control in *A. ervi*. In contrast, Colinet and Hance (2009) observed that the premating period increased in *A. colemani* after cold exposure.

Consequences for biological control

The rearing of *A. ervi* was refreshed regularly in the company, and we refreshed the rearing in our laboratory two times. However, such a culture does not represent the total diversity of a wild population of *A. ervi* and could have undergone some selection pressures as an effect of mass production. Consequently, our findings should only be extended to natural populations with caution.

Storage for biological control was usually done at temperatures under the development threshold (Bourdais et al. 2006, Amice et al. 2008). Here we used a temperature just above the development threshold. Our results showed that mummies stored above T_0 at 7°C provided a good emergence rate. Previous results observed the positive effect of utilisation a temperature above the development threshold. For example, Pandey and Johnson (2005) found that the emergence rate of *Anagyrus ananatis* increased from 46.1% at 10.1°C to 90.2% at 14.8°C (respectively below and above the development threshold of 12.65°C). Emerging females from mummies at 10.1°C seemed to live longer than ones emerged from mummies at 14.8°C.

For *Aphidius* species, Colinet et al (2006a) showed that emergence rate after storage for 2 weeks was significantly higher at 2°C than at 4°C (respectively below and above the development threshold of 2.8°C). Moreover, they pointed out that longevity for both sexes was affected at both temperatures. We can thereby conclude that the effects of temperatures above or below the development threshold on the emergence of individuals depend on the species.

To be an effective biological control agent, the parasitoids after cold storage have to meet several requirements regarding quantity, quality, and possibility of being released at the right moment. Our results showed that individuals after cold storage at constant temperature after 2 weeks present different costs that could affect their interest for biological control as progeny sex ratio which was male biased. Indeed, since hosts are only attacked by female wasps, this could reduce biological control program efficiency (Godfray 1994).

Our results therefore confirmed the beneficial effect of fluctuating temperature when storing mummies of *A. ervi* for two weeks at 7°C without any of the detrimental effects which appeared in constant regime on two measured fitness parameters. So two weeks of storage for the parasitoid *A. ervi* will be useful in the biological control program. However, fluctuating temperatures reduce the development time, which could be a problem during delivery for mass release of natural enemies in the field. This concern may be avoided if boxes where mummies are placed are provided with honey during the delivery, which could even be an opportunity to obtain mating before release.

For biological control, longer storage durations are technically more advantageous, but will induce more damage, first because a part of the individuals died, second because the survivors are selected (Amice et al. 2008) and third because more life-history traits of the survivors are affected (e.g. fecundity, mobility).

Acknowledgements

This study was supported by a scholarship from the ministry of Syrian higher education, and funded by the UMR 6553 CNRS Ecobio (University of Rennes1). We thank Viridaxis S.A. in Belgium for providing *A. ervi*. We are also grateful to Guy Boivin for helpful comments on an earlier version of the manuscript, and Jean-Sébastien Pierre for his help on the statistical analyses.

References

- Amice G, Vernon P, Outreman Y, van Alphen JJM, van Baaren J (2008) Variability in responses to thermal stress in parasitoids. *Ecol Entomol* 33:701-708
- Archer TL, Murray CL, Eikenbary RD, Starks KJ, Morrison RD (1973) Cold storage of *Lysiphlebus testaceipes* mummies. *Environ Entomol* 2:1104-1108
- Ayvaz A, Karasu E, Karabörklü S, Tunçbilek AS (2008) Effects of cold storage, rearing temperature, parasitoid age and irradiation on the performance of *Trichogramma evanescens* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *J Stored Prod Res* 44:232–240
- Bayram A, Ozcan H, Kornosor S (2005) Effect of cold storage on the performance of *Telenomus busseolae* Gahan (Hymenoptera: Scelionidae), an egg parasitoid of *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre) (Lepidoptera: Noctuidae). *Biol Control* 35:68–77
- Bourdais D, Vernon P, Krespi L, Le Lannic J, van Baaren J (2006) Antennal structure of male and female *Aphidius rhopalosiphi* DeStefani-Peres (Hymenoptera: Braconidae): description and morphological alterations after cold storage or heat exposure. *Microsc Res Techn* 69:1005–1013
- Bueno Jr R, van Cleave HW (1997) The effect of cold storage on the emergence of *Aphelinus perpallidus* a parasitoid of *Monellia caryella*. *Southwest Entomol* 22:39-51
- Chen WL, Leopold RA, Harris MO (2008) Cold storage effects on maternal and progeny quality of *Gonatocerus ashmeadi* Girault (Hymenoptera: Mymaridae). *Biol Control* 46:122–132
- Colinet H, Hance T, Vernon P (2006a) Water relations, fat reserves, survival, and longevity of a cold-exposed parasitic wasp *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Aphidiinae). *Environ Entomol* 35:228-236
- Colinet H, Renault D, Hance T, Vernon P (2006b) The impact of fluctuating thermal regimes on the survival of a cold-exposed parasitic wasp, *Aphidius colemani*. *Physiol Entomol* 31:234–240
- Colinet H, Hance T (2009) Male reproductive potential of *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Aphidiinae) exposed to constant or fluctuating thermal regimens. *Environ Entomol* 38:242-249
- Coudron TA, Eilersieck MR, Shelby KS (2007) Influence of diet on long-term cold storage of the predator *Podisus maculiventris* (Say) (Heteroptera: Pentatomidae). *Biol Control* 42:186–195

- Couillien D, Gregoire JC (1994) Take-off capacity as a criterion for quality control produced predators, *Rhizophagus grandis* (COL.: Rhizophagidae) for the biocontrol of bark beetles, *Dendroctonus micans* (COL.: Scolytidae). *Entomophaga* 39: 385-395
- Crawley MJ (1993) *GLIM for Ecologists*. Blackwell Scientific Publications, Oxford
- Eilenberg J, Hajek A, Lomer C (2001) Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl* 46:387-400
- Ellers J (1996) Fat and eggs: an alternative method to measure the trade-off between survival and reproduction in insect parasitoids. *Neth J Zool* 46:227-235
- Ellers J, van Alphen JJM (1997) Life history evolution in *Asobara tabida*: plasticity in allocation of fat reserves to survival and reproduction. *J Evol Biol* 10:771-785
- Godfray HCJ (1994) *Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology*. Princeton University Press, Princeton
- Häckermann J, Rott RA, Tschudi-Rein K, Dorn S (2008) Cold stored ectoparasitoid of *Cydia* fruit moths released under different temperature regimes. *BioControl* 53:857–867
- Hanna AD (1935) Fertility and tolerance of low temperature in *Euchalcidia carybori* Hanna (Hymenoptera: Chalcidinae). *Bull Entomol Res* 26:315-322
- Hagvar, EB, Hofsvang T (1991) Aphid parasitoids (Hymenoptera: Aphidiidae): biology, host selection and use in biological control. *Biocontrol. News Inform* 12:13-41
- Jalali SK, Singh SP (1992) Differential response of four *Trichogramma* species to low temperatures for short term storage. *Entomophaga* 37:159–165
- Kajita H (1967) Studies on the utilisation of natural enemies as ‘biotic insecticides’. On the acclimatization of rearing temperature for the low temperature storage of larvae and pupae of *Pseudaphycus malinus* Gahan. *Sci Bull Facul Agr Kyushu Univ* 23:29-32
- Kostal V, Vambera J, Bastl J (2004) On the nature of pre-freeze mortality in insects: water balance, ion homeostasis and energy charge in the adults of *Pyrrhocoris apterus*. *J Exp Biol* 207:1509-1521
- Kumar P, Shenhmar M, Brar KS (2005) Effect of low temperature storage on the efficiency of three species of trichogrammatids. *J Biol Control* 19:17–21
- Lacoume S, Bressac C, Chevrier C (2007) Sperm production and mating potential of males after a cold shock on pupae of the parasitoid wasp *Dinarmus basalis* (Hymenoptera: Pteromalidae). *J Insect Physiol* 53:1008-1015
- Legner EF (1976) Low storage temperature effects on the reproductive potential of three parasites of *Musca domestica*. *Ann Entomol Soc Amer* 69:435-441

- Leopold RA (1998) Cold storage of insects for integrated pest management. In: Hallman GJ, Denlinger DL (eds) Temperature sensitivity in insects and application in integrated pest management. Westview Press, Boulder, pp 235–267
- Leopold RA, Rojas RR, Atkinson PW (1998) Post pupariation cold storage of three species of flies: increasing chilling tolerance by acclimation and recurrent recovery period. *Cryobiology* 36:213-224
- Le Ralec A (1991) Les hyménoptères parasitoïdes : Adaptations de l'appareil reproducteur femelle. Morphologie et ultrastructure de l'ovaire, de l'oeuf et de l'ovipositeur. Thèse de Doctorat, Université de Rennes 1
- Levie A, Vernon P, Hance T (2005) Consequences of acclimation on survival and reproductive capacities of cold-stored mummies of *Aphidius rhopalosiphii* (Hymenoptera: Aphidiinae). *J Econ Entomol* 98:704–708
- López SN, Botto E (2005) Effect of cold storage on some biological parameters of *Eretmocerus corni* and *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Biol Control* 33:123–130
- Luczynski A, Nyrop JP, Shi A (2007) Influence of cold storage on pupal development and mortality during storage and on post-storage performance of *Encarsia formosa* and *Eretmocerus eremicus* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Biol Control* 40:107–117
- March PM (1977) Notes on the taxonomy and nomenclature of *Aphidius* species (Hymenoptera: Aphididae) parasitic on the pea aphid in North America. *Entomophaga* 22:365-372
- Michaud JP, Qureshi JA (2006) Reproductive diapause in *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae) and its life history consequences. *Biol Control* 39:193–200
- Okine JS, Mitchell ER, Hu GY (1996) Low temperature effect on viability of *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae) pupae and effect on this parasitoid on feeding rate of Diamondback moth larvae (Lepidoptera: Plutellidae). *Fla Entomol* 79:503-509
- Pandey RR, Johnson MW (2005) Effects of cool storage on *Anagyrus ananatis* Gahan (Hymenoptera: Encyrtidae). *Biol Control* 35:9–16
- Pavlik J (1993) The size of the female and quality assessment of mass-reared *Trichogramma* spp. *Entomol Exp Appl* 66:171-177
- Pitcher SA, Hoffmann MP, Gardner J, Wright MG, Kuhar TP (2002) Cold storage of *Trichogramma ostriniae* reared on *Sitotroga cerealella* eggs. *BioControl* 47: 525-535.

- Pompanon F, Boulétreau M (1997) Effect of diapause and developmental host species on the circadian loco-motor activity rhythm of *Trichogramma brassicae* females. *Entomol Exp Appl* 82: 231-234
- R Development Core Team (2008) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0 [WWW document]. URL <http://www.R-project.org>
- Ramesh B, Manickavasagam S (2003) Trade off between longevity and fecundity in relation to host availability in a thelytokous oophagous parasitoid, *Trichogramma Brasiliensis* Ashmead (Trichogrammatidae: Hymenoptera). *Insect Sci Appl* 23:207-210
- Renault D, Salin C, Vannier G, Vernon P (2002) Survival at low temperatures in insects: what is the ecological significance of the supercooling point? *CryoLetters* 23:217-228
- Rigaux M, Vernon P, Hance T (2000) Relationship between acclimation of *Aphidius rhopalosiphi* (De Stefani-Peres) in autumn and its cold tolerance (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Mededelingen Facul Landbouwwetenschappen Univ Gent* 65:253–263
- Roux O, Le Lann C, van Alphen JJM, van Baaren J (In press) How does heat shock affect the life history traits of adults and progeny of the aphid parasitoid *Aphidius avenae* (Hymenoptera: Aphidiidae)? *Bull Entomol Res.*
- Rudolf E, Malausa JC, Millot P, Plavorio R (1993) Influence des basse températures sur les potentialités biologiques d'*Orius laevigatus* et d'*Orius majusculus* (Het. : Anthocoridae). *Entomophaga* 38:317-325
- Rundle BJ, Thomson LJ, Hoffmann AA (2004) Effects of Cold Storage on Field and Laboratory Performance of *Trichogramma carverae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and the Response of Three *Trichogramma* spp. (*T. carverae*, *T. nr. brassicae*, and *T. funiculatum*) to Cold. *J Econ Entomol* 97:213–221
- Sigsgaard L (2000) The temperature-dependent duration of development and parasitism of three cereal aphid parasitoids, *Aphidius ervi*, *A. rhopalosiphi* and *Praon volucre*. *Entomol Exp Appl* 95:173-184
- Starý P (1978) Seasonal relations between lucerne, red clover, wheat and barley agroecosystems through the aphids and parasitoids (Homoptera Aphididae; Hymenoptera, Aphidiidae). *Acta Entomol Bohemos* 75:296–311
- Starý P, Lyon JP, Leclant F (1988) Biocontrol of aphids by the introduced *Lysiphlebus testaceipes* (Cress.) (Hym., Aphidiidae) in Mediterranean France. *J Appl Entomol* 105:74-87

- Stilmant D (1994) Differential impact of three *Sitobion avenae* parasitoids. *Norweg J Agr Sci* 16:89-99
- Stilmant D, van Bellinghen C, Hance T, Boivin G (2008) Host specialization in habitat specialists and generalists. *Oecologia* 156:905-912
- Terblanche JS, Klok CJ, Chown SL (2004) Metabolic rate variation in *Glossina pallidipes* (Diptera: Glossinidae): gender, ageing and repeatability. *J Insect Physiol* 50:419-428
- Vernon P, Vannier G (1996) Developmental patterns of supercooling capacity in a subantarctic wingless fly. *Experientia* 52:155-158
- Visser B, Ellers J (2008) Lack of lipogenesis in parasitoids: A review of physiological mechanisms and evolutionary implications. *J Insect Physiol* 54:1315-1322
- Whitaker-Deerberg RL, Michels GJ, Wendel LE, Farooqui M (1994) The effect of short-term cold storage on emergence of *Aphelinus asychis* Walker (Hymenoptera: Aphelinidae) mummies. *Southwest Entomol* 19:115-118

Table 1. Longevity in days (mean \pm SE) for males and females among the 5 treatments. Cox proportional hazard model was used to compare within each sex among the treatments. Letters indicate significant differences among treatments (T: control, C1: 1 wk at constant temperature, C2: 2 wks at constant temperature, F1: 1 wk at fluctuating temperature, and F2: 2 wks at fluctuating temperature).

Treatments	Males	Females
T	21.60 \pm 0.71	24.03 \pm 1.18 a
C1	18.67 \pm 1.00	22.50 \pm 1.26 ab
C2	17.93 \pm 1.06	18.17 \pm 1.36 b
F1	20.17 \pm 1.07	24.47 \pm 0.91 a
F2	19.83 \pm 1.14	20.70 \pm 1.46 ab
Test	$\chi^2 = 3.86$; $df = 4$; $p = 0.42$	$\chi^2 = 11.2$; $df = 4$; $p = 0.02$

Table 2. Values of physiological traits indicators (mummies, males, and females) according to treatments. Data are presented as means \pm SE. Letters represent significant differences among treatments (T: control, C1: 1 wk at constant temperature, C2: 2 wks at constant temperature, F1: 1 wk at fluctuating temperature, and F2: 2 wks at fluctuating temperature).

Physiological parameters	Treatments	Mummies	Males	Females
Dry mass (mg)	T	0.141 \pm 0.007 ab	0.066 \pm 0.009	0.064 \pm 0.005
	C1	0.117 \pm 0.007 b	0.056 \pm 0.005	0.065 \pm 0.006
	C2	0.140 \pm 0.009 ab	0.061 \pm 0.005	0.060 \pm 0.003
	F1	0.151 \pm 0.008 a	0.059 \pm 0.004	0.065 \pm 0.004
	F2	0.140 \pm 0.008 ab	0.059 \pm 0.004	0.061 \pm 0.004
			$\chi^2= 12.16; df= 4; p = 0.016$	$\chi^2= 1.98; df= 4; p = 0.74$
Water mass (mg)	T	0.297 \pm 0.017 a	0.128 \pm 0.015	0.132 \pm 0.006
	C1	0.210 \pm 0.012 b	0.109 \pm 0.008	0.138 \pm 0.010
	C2	0.241 \pm 0.018 ab	0.132 \pm 0.008	0.135 \pm 0.007
	F1	0.264 \pm 0.011 ab	0.115 \pm 0.006	0.134 \pm 0.007
	F2	0.258 \pm 0.013 ab	0.115 \pm 0.006	0.129 \pm 0.008
			$\chi^2= 17.76; df= 4; p = 0.001$	$\chi^2= 6.65; df= 4; p = 0.16$
Water content	T	2.123 \pm 0.096 a	2.048 \pm 0.083	2.131 \pm 0.063
	C1	1.806 \pm 0.041 b	2.002 \pm 0.065	2.195 \pm 0.071
	C2	1.726 \pm 0.077 b	2.207 \pm 0.086	2.256 \pm 0.066
	F1	1.787 \pm 0.048 b	2.103 \pm 0.100	2.112 \pm 0.054
	F2	1.870 \pm 0.047b	2.025 \pm 0.067	2.182 \pm 0.081
			$\chi^2= 12.62; df= 4; p < 0.013$	$\chi^2= 4.09; df= 4; p = 0.39$
Lean dry mass (mg)	T	0.100 \pm 0.005 ab	0.042 \pm 0.004	0.044 \pm 0.003
	C1	0.090 \pm 0.004 b	0.039 \pm 0.003	0.045 \pm 0.003
	C2	0.107 \pm 0.006 ab	0.044 \pm 0.003	0.045 \pm 0.002
	F1	0.109 \pm 0.005 a	0.041 \pm 0.002	0.045 \pm 0.003
	F2	0.106 \pm 0.005 ab	0.043 \pm 0.003	0.045 \pm 0.003
			$\chi^2= 10.58; df= 4; p = 0.027$	$\chi^2= 3.11; df= 4; p = 0.54$
Fat mass (mg)	T	0.041 \pm 0.003 a	0.024 \pm 0.005	0.020 \pm 0.002
	C1	0.027 \pm 0.003 b	0.017 \pm 0.002	0.020 \pm 0.003
	C2	0.033 \pm 0.004 ab	0.017 \pm 0.002	0.015 \pm 0.002
	F1	0.042 \pm 0.004 a	0.018 \pm 0.002	0.019 \pm 0.002
	F2	0.035 \pm 0.003 ab	0.016 \pm 0.002	0.016 \pm 0.002
			$\chi^2= 13.62; df= 4; p = 0.008$	$\chi^2= 2.25; df= 4; p = 0.69$
Fat content	T	0.416 \pm 0.027 a	0.531 \pm 0.063	0.44 \pm 0.048
	C1	0.286 \pm 0.025 b	0.438 \pm 0.044	0.407 \pm 0.047
	C2	0.278 \pm 0.023 b	0.394 \pm 0.050	0.328 \pm 0.036
	F1	0.370 \pm 0.022 ab	0.436 \pm 0.031	0.423 \pm 0.040
	F2	0.323 \pm 0.029 ab	0.379 \pm 0.040	0.347 \pm 0.036
			$\chi^2= 18.10; df= 4; p = 0.001$	$\chi^2= 5.88; df= 4; p = 0.21$

Table 3. Summary of positive and negative effects of treatments on life history traits (-: affected, +: not affected). T: control, C1: 1 wk at constant temperature, C2: 2 wks at constant temperature, F1: 1 wk at fluctuating temperature, and F2: 2 wks at fluctuating temperature.

	T	C1	C2	F1	F2
Survival	+	+	+	+	+
Male longevity	+	+	+	+	+
Female longevity	+	+	-	+	+
Fecundity at emergence	+	+	+	+	+
Lifetime fecundity and longevity	+	+	+	+	+
Survival of the next generation	+	+	+	+	+
Sex ratio	+	+	-	+	+
Asymmetry of antennae	+	+	+	+	+
Mating capacity	+	+	+	+	+
Fat content	+	-	-	+	+
Water content	+	-	-	-	-

Figure legends

Figure 1. Time needed for mummies to emerge at 20°C after cold exposure at 7°C (mean \pm SE) in relation to the treatments. Letters indicate a significant difference among treatments (T: control, C1: 1 wk at constant temperature, C2: 2 wks at constant temperature, F1: 1 wk at fluctuating temperature, and F2: 2 wks at fluctuating temperature).

Figure 2. Sex ratio progeny expressed as the proportion of females according to the duration of cold-exposure for each treatment. Letters indicate a significant difference among treatments (T: control, C1: 1 wk at constant temperature, C2: 2 wks at constant temperature, F1: 1 wk at fluctuating temperature, and F2: 2 wks at fluctuating temperature). Data are presented as mean \pm SE.

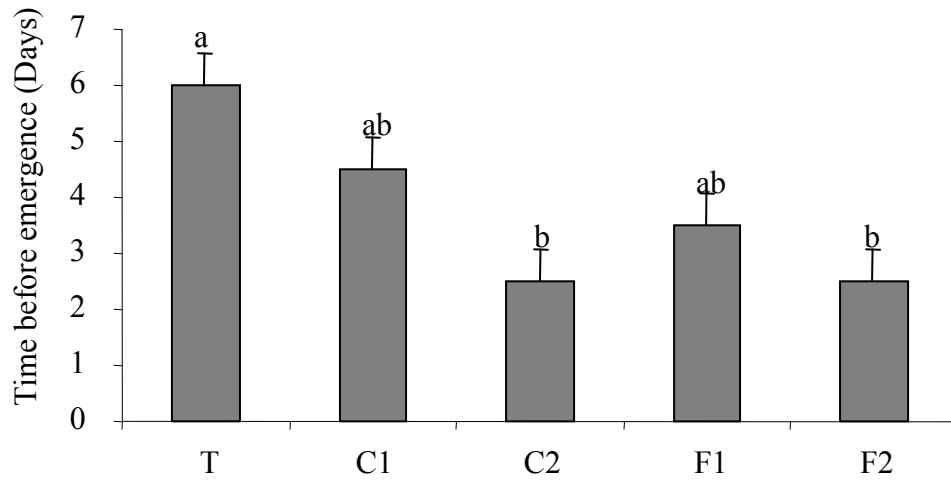
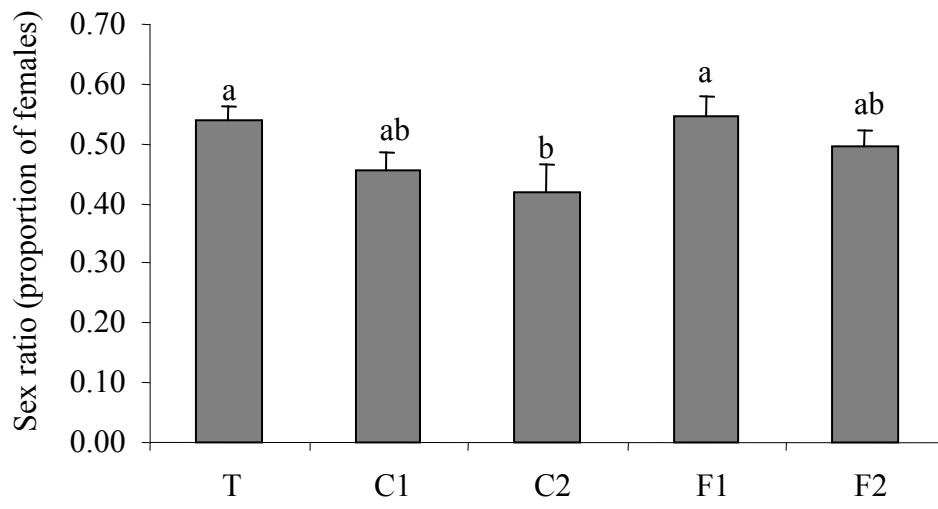
Figure 1

Figure 2

Appendix 1. Effect of cold storage on asymmetry of antennae for each sex. 30 males and 30 females for each treatment were used to measure the asymmetry rate. Data are shown as the percentage of adults (\pm SE), presenting a different number of antennomeres in their antennae (T: control, C1: 1 wk at constant temperature, C2: 2 wks at constant temperature, F1: 1 wk at fluctuating temperature, and F2: 2 wks at fluctuating temperature).

Treatment	Males asymmetry (%)	Females asymmetry (%)
T	3.30 \pm 3.28	0
C1	6.70 \pm 4.55	6.70 \pm 4.55
C2	13.30 \pm 6.21	13.30 \pm 6.21
F1	6.70 \pm 4.55	10.00 \pm 5.48
F2	3.30 \pm 3.28	6.70 \pm 4.55
$\chi^2 = 3.19; df = 4; p = 0.53$		$\chi^2 = 4.32; df = 4; p = 0.36$

Appendix 2. Percentage (\pm SE) of females mating success with males from the same treatment (T: control, C1: 1 wk at constant temperature, C2: 2 wks at constant temperature, F1: 1 wk at fluctuating temperature, and F2: 2 wks at fluctuating temperature). N = 25 females for each treatment.

Treatment	1 st male (%)	2 nd male (%)	3 rd male (%)	No mating (%)
T	76 \pm 9	4 \pm 4	8 \pm 5	12 \pm 6
C1	56 \pm 10	12 \pm 6	16 \pm 7	16 \pm 7
C2	40 \pm 10	28 \pm 9	12 \pm 6	20 \pm 8
F1	60 \pm 10	16 \pm 7	4 \pm 4	20 \pm 8
F2	56 \pm 10	20 \pm 8	4 \pm 4	20 \pm 8
$\chi^2 = 6.75; df = 4; p = 0.15$ $\chi^2 = 5.95; df = 4; p = 0.20$ $\chi^2 = 3.39; df = 4; p = 0.49$ $\chi^2 = 0.88; df = 4; p = 0.93$				

Appendix 3. Duration (in seconds) of different mating phases (d1: latency to the first contact, d2: time between the first contact and the beginning of mounting, d3: mounting duration, d4: copulation duration). χ^2 of Kruskal-Wallis test, and data are presented as mean \pm SE. T: control, C1: 1 wk at constant temperature, C2: 2 wks at constant temperature, F1: 1 wk at fluctuating temperature, and F2: 2 wks at fluctuating temperature. N = 25 females for each treatment.

Treatment	d1	d2	d3	d4
T	35.86 \pm 9.08	129.45 \pm 27.85	27.36 \pm 2.92	74.50 \pm 3.32
C1	45.05 \pm 5.43	103.29 \pm 27.68	27.33 \pm 3.16	78.10 \pm 3.21
C2	40.55 \pm 9.51	83.55 \pm 20.29	31.45 \pm 5.60	75.00 \pm 3.34
F1	51.30 \pm 9.62	121.45 \pm 24.02	22.05 \pm 2.45	80.50 \pm 3.86
F2	31.60 \pm 6.77	104.85 \pm 27.16	35.90 \pm 6.61	81.55 \pm 10.45
$\chi^2 = 3.19; df = 4; p = 0.53$ $\chi^2 = 1.85; df = 4; p = 0.76$ $\chi^2 = 3.75; df = 4; p = 0.44$ $\chi^2 = 2.26; df = 4; p = 0.69$				

Chapitre 4

Thermal stress resistance, size and fitness in energetically constrained ectotherms: is smaller better?

Mohannad Ismail, Philippe Vernon, Thierry Hance, Jean-Sebastien Pierre, and Joan van Baaren

Submitted in Functional ecology

Thermal stress resistance, size and fitness in energetically constrained ectotherms: is smaller better?

Mohannad Ismail^{1,3}, Philippe Vernon², Thierry Hance³, Jean-Sebastien Pierre¹, and Joan van Baaren¹

1 Université de Rennes 1, UMR 6553 CNRS - EcoBio, France.

2 Université de Rennes 1, Station Biologique de Paimpont, UMR 6553 CNRS - EcoBio, France.

3 Université catholique de Louvain. Earth and life Institute, Biodiversity Research Centre, Place Croix du Sud, 4-5, 1348, Louvain-la-Neuve, Belgique.

UMR 6553 CNRS—EcoBio, Université de Rennes 1,
263 Avenue du Général Leclerc, CS74205,
35042 Rennes
France
e-mail: mohannad.ismail@univ-rennes1.fr

Résumé

Dans des conditions non stressantes, la taille influence généralement positivement plusieurs traits de fitness mais peu d'études ont évalué cette corrélation dans des environnements stressants. Deux hypothèses principales ont été proposées pour expliquer les conséquences d'un stress énergétique sur les grands et les petits individus : (1) the Absolute Energy Demand hypothesis (AED), qui prédit que les plus grands individus ont besoin de plus d'énergie pour soutenir leurs fonctions, et donc que les petits individus survivraient mieux à un stress du fait de leurs moindres besoins énergétiques. (2) the Relative Efficiency hypothesis (RE), qui prédit que les plus grands individus seront favorisés dans un environnement stressant énergiquement car ils auraient proportionnellement une meilleure efficacité dans l'utilisation de leurs réserves.

Nous avons comparé les effets d'un stress au froid sur les performances des grands et des petits individus chez le parasitoïde *Aphidius ervi*, et nous avons mesuré leur consommation et l'allocation des réserves de lipides entre différents traits. Nous avons exposé des momies d'*A. ervi* à 5 traitements (témoin à 20°C; 7C1 et 7C2: température constante pour 1 et 2 semaines à 7°C respectivement; 4C1 et 4C2: température constante pour 1 et 2 semaines à 4°C respectivement).

Après le stress lié au stockage au froid, les femelles de grande taille émergées en 7C2 et 4C2 ont montré une diminution dans les traits de fitness étudiés (la longévité, la charge en œuf à l'émergence, la fécondité réalisée), alors que les grands mâles ont montré une réduction dans leur longévité dans le traitement 7C2 uniquement. La consommation des réserves lipidiques chez les grands individus est plus marquée que celle des petits individus, ce qui pourrait expliquer la perte de fitness chez les grands individus.

Nos résultats supportent donc plus l'hypothèse AED. En outre, nous avons trouvé que les femelles de petite taille montrent une charge en œufs à l'émergence plus importante que celle des petites femelles témoins. Comme la fécondité réalisée est égale, cela met en évidence que dans des environnements stressants, les petites femelles investissent leur énergie vers une fécondité plus précoce.

Mots clés : Absolute Energy Demand hypothesis (AED), lipides, Relative Efficiency hypothesis (RE), stress au froid, taille

Summary

1. In non-stressful conditions, it is known that body size is generally positively linked with fitness in ectotherms. However, few studies have examined this relation in stressful environments. Two main hypotheses were found to explain the consequences of being large: (1) The Absolute Energy Demand hypothesis (AED), which predicts that the largest individuals require more global energy to sustain their body functions; (2) The Relative Efficiency hypothesis (RE), which predicts that the larger individuals will be advantaged in an energetically stressful environment since they used their reserves more efficiently.

2. We compared the effects of a cold stress on the fitness of large and small individuals of the parasitoid wasp *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Aphidiinae) and we measured their respective levels and allocation of lipid reserves. We exposed nymphs of this wasp to 5 treatments as follows (control at 20°C; 7C1 and 7C2: constant cold temperature for 1 and 2 weeks at 7°C respectively; 4C1 and 4C2: constant cold temperature for 1 and 2 weeks at 4°C respectively).

3. After cold stress, only the emerged large females in 7C2 and 4C2 showed a decrease in the studied fitness traits (longevity, egg load at emergence, life-time fecundity). The decrease in lipid reserves in large adults was possibly responsible for the decrease in their fitness.

4. In summary, our results thereby supported the AED hypothesis. Furthermore, the small females allocated a large amount of their energy to produce a higher number of eggs at emergence when compared to the control females. This highlights that in stressful environments, small females change their reproductive strategy from a synovigenic to a provigenic strategy.

Key-words: Absolute Energy Demand hypothesis (AED), body size, cold stress, lipid, Relative Efficiency hypothesis (RE)

Introduction

A key feature of the ecology and evolution theories is body size (Angilletta, Steury & Sears 2004), since it affects all aspects of animal physiology, life history and consequently, fitness. It is generally considered as an indicator of the quality of an individual; in other words, a larger body size is associated with a higher fitness in many animal species (e.g. Stearns 1992; Andersson 1994; Chown & Gaston 2010). It was also shown that larger individuals generally have a better resistance than smaller ones to stresses linked to energy reserves, for example starvation stress (Cushman, Lawton & Manly 1993; Arnett & Gotelli 2003; Rivero & West 2002).

In the case of stress, two physiological hypotheses have been suggested to compare the resistance of individuals to energy constraints in function of their size. The first one is the absolute energy demand hypothesis (AED), which predicts that larger individuals require more energy to sustain their body functions (Blanckenhorn, Preziosi & Fairbairn 1995; Wikelski, Carrillo & Trillmich 1997; Blanckenhorn 2005; Reim, Teuschl & Blanckenhorn 2006a), probably because of a proportionally higher metabolic rate (Calder 1984; Gillooly et al. 2001). The second one, is the relative efficiency hypothesis (RE), predicts that larger individuals will be advantaged in an energetically stressful environment (Arnett & Gotelli 2003; Reim, Teuschl & Blanckenhorn 2006b; Blanckenhorn, Fanti & Reim 2007) since they use their reserves more efficiently, probably because of a proportionally lower metabolic rate (Lehmann, Dickinson & Staunton 2000; Bokma 2004; Glazier 2005; Savage et al. 2007; Blanckenhorn et al. 2007). However, few studies have really explored the link between the amount of lipid reserves, size and stress resistance (Renault *et al.* 2003; Colinet, Vernon & Hance 2007).

Insect parasitoids are a good candidate model to assess the importance of size on stress resistance and then to determine which hypothesis applies. These insects have an immature life stage that develops on or within a single insect host (Godfray 1994), ultimately killing the host. Consequently, parasitoid resources are often limited by this nutrition (Olson et al. 2000). In parasitoids, most of the studies converge to the fact that large individuals have better fitness (e.g. Visser 1994; West, Flanagan & Godfray 1996; Rivero & West 2002). Indeed, large female individuals are expected to live longer, to have higher fecundity, higher mating success, and better dispersal ability than small ones (Ellers, van Alphen & Sevenster 1998; Sagarra, Vincent & Stewart 2001; Doyon & Boivin 2005). Similarly, it was found that smaller males were rarely able to fertilize a female in competition with larger males (Boivin & Lagacé 1999), and that larger individuals have larger organs which contain more sperms than smaller

ones (Martel et al. 2011). Moreover, the costs of being large suggested by Blanckenhorn (2000), as viability costs of long development time and energy costs of supporting large size seem generally not to apply: for example, there is not always a direct relationship between size and development time (Joffrey Moiroux, unpublished data). The amount of lipids available is the main factor mediating the relationship between fitness and size (Rivero & West 2002), which is also considered as the main resource to resist a stress (Djawdan et al. 1998). It has been found in parasitoids that lipid reserve is positively correlated with fitness parameters and with body size during adult life (Ellers 1996; Ellers & van Alphen 1997). Lipid quantity is limited because most parasitoid species are unable to synthesize lipids during adult life (Ellers et al. 1998; Olson et al. 2000; Visser et al. 2010), inducing trade-offs between different functions such as longevity and fecundity (Ellers 1996).

In parasitoids, an energetic stress influencing energy concentration is the stress linked to the cold storage of parasitoid nymphs in the aim of producing large amount of individuals for inundative release programs of biological control. This storage is realized at low temperature during few weeks on nymphs. It is known that adult size is determined by the size of the nymph and which available energy providing from hosts is fixed as no nutrition could occur. An increasing consumption of lipid reserves in function of the duration of cold exposure was demonstrated, and may explain the decrease in fitness parameters such as longevity or fecundity (Colinet, Hance & Vernon 2006a; Ismail et al. 2010).

In this paper we determine if different life history traits linked to fitness (longevity, fecundity at emergence, total fecundity) are more affected in large or small individuals in our model species, the parasitic wasp *Aphidius ervi* (Fig. 1), to specify if this species is concerned by the absolute energy demand hypothesis (AED) or by the relative efficiency hypothesis (RE). If the fitness traits are differently affected in large and small individuals, the trade-offs between these traits could also be affected differently according to size. As previous studies on *A. ervi* have shown that in case of stress linked to cold storage, energy is invested more in fecundity than in maintenance, which means that the first affected trait by energy limitation is longevity (Ismail et al. 2010), there should be a difference in strategy of energy allocation linked to the size, as large or small individuals will be more energetically constrained. In parasitoids, there is a sexual size dimorphism, males are usually smaller than females. Moreover, the gamete production is considered as less costly in males than in females (Ernsting & Isaaks 2002). It was also shown that females oviposit a greater proportion of daughters in large hosts than in smaller ones, as small hosts contain less energy than larger ones (Charnov et al. 1981; Seidl & King 1993), and as the advantage of being large is more

important for females than for males (Colinet et al. 2006b). It was demonstrated that low quality hosts affect relatively more females than males (Charnov et al. 1981; Sequeira and Mackauer 1992). For all these reasons showing that males seem to be less energetically constrained than females, stress induced by cold storage should be less intense for males than for females. To our knowledge no study has focused on distinguishing the effects of this type of stress on large and small individuals.

Materials and methods

We chose the parasitoid *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae) as a model as it is commercially produced and widely distributed in several European countries for mass release. It is a common cosmopolitan solitary endo-parasitoid (March 1977) of several aphid species of economically important crops such as legumes and cereals (Starý 1978, Stilmant et al. 2008). A large batch (more than 300 mummies) of *A. ervi* reared on the grain aphid *Sitobion avenae* F (Homoptera: Aphididae) was provided in January 2007, and another one in January 2008 by Viridaxis S.A. in Belgium. This company regularly renewed their rearing. In our laboratory, it was reared on a SA1 clone (INRA collection) of the same host species, which was collected from the wheat crops around Rennes in France in 1990. The aphids were reared under laboratory conditions in small pots of wheat (*Triticum aestivum* L, cv. Boston). Parasitoids and hosts were maintained in Plexiglas cages (50 × 50 × 50 cm) in climate rooms at 20 ± 1°C, 60 ± 10% RH with a photoperiod 16L: 8D. *Aphidius ervi* was reared for three generations before the experiments.

Aphid parasitoids stop feeding when the larva spins its cocoon inside the empty cuticle of the aphid forming a “mummy” and pupates. One-day-old nymphs inside mummies are considered the more suitable instar for storage in aphid parasitoids (Levie et al. 2005). We used two temperatures of storage (7, and 4°C) respectively above and below the mummy-adult development threshold, which is 6.6°C for *A. ervi* (Sigsgaard 2006). The mummies of *A. ervi* were randomly assigned to 20°C and to two cold temperatures, 7 and 4°C. For each cold temperature, we used two periods of storage duration, 1 and 2 weeks. We had consequently 5 treatments as following: control (Cntrl) at 20°C; 7C1: constant cold temperature for 1 week at 7°C; 7C2: constant cold temperature for 2 weeks at 7°C; 4C1: constant cold temperature for 1 week at 4°C; and 4C2: constant cold temperature for 2 weeks at 4°C.

For both temperatures, mummies were acclimated by exposing them progressively from 20°C to 7°C (with 2h at 17, 14 and 11°C), and to 4°C (with 2h at 16, 12 and 8°C), as described by Levie et al. (2005). They were then kept in a thermo-regulated Sanyo incubator

(Electric Co. Ltd, Japan) with a thermal precision of $\pm 1^{\circ}\text{C}$, under a photoperiod 16L: 8D. After cold storage, mummies were progressively transferred to 20°C , with 2 hours at 11, 14, and 17°C for mummies stored at 7°C , and with 2 hours at 8, 12, and 16°C for mummies stored at 4°C . To avoid an incubation effect, the incubators used for each treatment were regularly permuted. For all treatments, we measured emerged adults' longevity without food, their egg load at emergence, their lifetime fecundity and their lipid content at emergence.

To correlate body size with fitness parameters, we measured the length of the hind tibia of each individual with the numeric image analysis software Pegasus Pro V4 under a binocular ($\times 3.15$, Olympus SZ6045TR) linked to a video camera (JVC KY-F50). Tibia length is the most common indicator of body size in parasitoid wasps (Godfray 1994).

Emergence rate

The emergence rate was measured by placing 100 mummies per treatment individually in a small gelatine capsules ($\text{Ø} = 0.5 \text{ cm}$, $L = 1.5 \text{ cm}$). Adult emergence rate was expressed as the number of individuals which emerged from these 100 mummies

Longevity

After emergence, we measured adult longevity without food ($N = 20$ males and 20 females), since it is representative of the energetic reserves remaining inside the body after the storage. Adults were put individually without hosts into small tubes (1.5 cm diameter and 10 cm long), and lifespan was measured by observing them one time daily until death.

Egg load at emergence

30 females about 2 h old per treatment were dissected in a drop of water on a microscope slide under a microscope ($\times 4$, Olympus BH2) to count the number of mature eggs in the ovaria at emergence. Mature eggs were distinguished from non mature eggs as they were completely formed (Le Ralec 1991).

Lifetime fecundity

15 females mated with a male from the same treatment were transferred to a small pot containing a wheat plant with about 100 aphids of 3rd and 4th larval instars. These pots were renewed every day during five days and then 1 time every 3 days until the death of the female. The females were also provided with honey. This experiment was carried out at $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ with

a 16L: 8D photoperiod. Lifetime fecundity was evaluated by counting the number of mummies obtained.

Lipid reserves

To estimate the lipid reserve at emergence (N = 20 males and 16 females per treatment), we first measured the dry mass by exposing the adults for 3 days to 60°C in an air oven. To evaluate the lipid concentration, each dried adult was placed for 2 weeks in an Eppendorf tube containing 1ml of the extracting solution chloroform/methanol (2:1) (Vernon & Vannier 1996). Then the adults were dried for 12 h in an air oven at 60°C to remove the extracting solution to measure the lean dry mass. Body lipid mass was obtained by subtracting the lean dry mass from the dry mass. Adults were measured by using a micro-electronic balance (sensitivity 0.1 µg, Mettler Toledo XP2U, Switzerland).

To correlate the lipid reserves to body size, we used the lean dry mass as an indicator of the body mass. Results were available only for control individuals and for individuals that emerged from 7°C for one and two weeks.

Statistical analyses

Emergence rates (i.e., proportions of adults that successfully emerge) were compared among treatments using χ^2 tests. Linear regressions were used to examine the relationship between size and fitness traits (longevity, egg load, lifetime fecundity), and between body mass and concentration of lipid reserves. To analyse the difference between the slopes in the treatments, we used analysis of covariance (ANCOVA; with linear model: type III SAS) with temperature and duration as factors, and size as covariate, followed by a 2 by 2 slopes comparison (*compslope*, a function written in R by Pr. Jean-Sébastien Pierre), the p value was corrected by Bonferroni ($\alpha = 0.05/k$, where k is the comparisons number). Statistical analyses were done using the statistical package R version 2.8.0 (R Development Core Team, 2008), functions *lm* and *compslope*.

Results

Emergence rate

The emergence rate of *A. ervi* did not decline with storage duration and was similar to the control ($\chi^2 = 0.50$; $df = 4$; $p = 0.974$). All treatments showed a high emergence rate (T = 96.55

± 1.82 , 7C1 = 95.96 ± 1.97 , 7C2 = 95.10 ± 2.16 , 4C1 = 91.07 ± 2.85 , and 4C2 = 86.29 ± 3.44 %).

Longevity

The relationship between starved female longevity and size is shown in Figure 2 (a, b). Longevity increased significantly with body size in the control ($F_{1,18} = 21.37$, $r^2 = 0.54$, $p < 0.001$), and the 7C1 ($F_{1,18} = 6.04$, $r^2 = 0.25$, $p < 0.02$) treatments, whereas no relation was found in the 7C2 ($F_{1,18} = 2.50$, $r^2 = 0.12$, $p = 0.13$), 4C1 ($F_{1,18} = 1.76$, $r^2 = 0.08$, $p = 0.20$) and 4C2 ($F_{1,18} = 0.09$, $r^2 = 0.005$, $p = 0.76$) treatments. The slope comparison (2 by 2) tests indicated that there were no significant differences among all the treatments. We observed that longevity of smaller females in the C2 treatments at 7 and 4°C was equivalent to longevity of small control females, whereas longevity of larger females in the same treatments was lower than the ones of the control.

The relationship between starved male longevity and size is shown in Figure 2 (c, d). Longevity increased significantly with body size in the control ($F_{1,18} = 13.10$, $r^2 = 0.42$, $p = 0.001$), the 7C1 ($F_{1,18} = 16.83$, $r^2 = 0.48$, $p < 0.001$), the 4C1 ($F_{1,18} = 12.55$, $r^2 = 0.41$, $p = 0.002$), and the 4C2 ($F_{1,18} = 5.66$, $r^2 = 0.24$, $p = 0.02$) treatments, whereas no relation was found in the 7C2 treatment ($F_{1,18} = 2.39$, $r^2 = 0.12$, $p = 0.14$). The slope comparison (2 by 2) tests indicated that there were no significant differences among all the treatments. We observed that longevity of smaller males in the C2 treatments at 7 and 4°C was equivalent to longevity of small control males, whereas longevity of larger males in the same treatments was lower than the ones of the control.

Egg load at emergence

Egg load at emergence increased significantly with body size in the control ($F_{1,28} = 21.35$, $r^2 = 0.433$, $p < 0.001$), the 7C1 ($F_{1,28} = 18.88$, $r^2 = 0.40$, $p < 0.001$) and the 4C1 ($F_{1,28} = 10.45$, $r^2 = 0.27$, $p = 0.003$) treatments, whereas no relation was found in the 7C2 ($F_{1,28} = 0.08$, $r^2 = 0.002$, $p = 0.78$) and 4C2 ($F_{1,28} = 0.09$, $r^2 = 0.003$, $p = 0.76$) treatments (Fig. 3, a, b). The slope comparison (2 by 2) tests indicated significant differences among all the treatments (Table 1). In particular, we observed that egg load of the small females of the C2 treatments at 7 and 4°C was higher than egg load of the small control females, whereas egg load of the large females in the same treatments was lower than egg load of the large control females.

Lifetime fecundity

Lifetime fecundity increases significantly with body size in the control ($F_{1,16} = 15.15$, $r^2 = 0.49$, $p = 0.001$), and in the 7C1 and the 4C1 ($F_{1,11} = 11.82$, $r^2 = 0.52$, $p = 0.005$), ($F_{1,11} = 6.59$, $r^2 = 0.38$, $p = 0.03$) treatments respectively, whereas no relation was found between the fecundity and size in the 7C2 ($F_{1,11} = 4.42$, $r^2 = 0.29$, $p = 0.06$) and the 4C2 ($F_{1,11} = 2.16$, $r^2 = 0.16$, $p = 0.17$) treatments (Fig. 3, c, d). The slope comparison (2 by 2) tests indicated no significant differences among all the treatments. We observed that lifetime fecundity of the small females of the C2 treatments at 7 and 4°C was equivalent to lifetime fecundity of the small control females, whereas lifetime fecundity of the large females in the same treatments was lower than lifetime fecundity of the large control females.

Lipid reserves

The lipid reserves for both sexes were positively correlated to the body mass in the control (Female: $F_{1,14} = 15.12$, $r^2 = 0.52$, $p < 0.001$; Male: $F_{1,14} = 26.33$, $r^2 = 0.59$, $p < 0.001$), and in the 7C1 treatments (Female: $F_{1,14} = 22.47$, $r^2 = 0.61$, $p < 0.001$; Male: $F_{1,18} = 17.40$, $r^2 = 0.49$, $p < 0.001$). In contrast, we found no relation in the 7C2 treatments for both sexes (Female: $F_{1,14} = 0.71$, $r^2 = 0.05$, $p = 0.42$; Male: $F_{1,18} = 2.76$, $r^2 = 0.13$, $p = 0.11$) (Fig. 4). The slope comparison (2 by 2) tests indicated significant differences among the treatments in both females and males (Table 2). Our results showed that small females and males in the C2 treatment at 7°C have fat reserves as well as the small individuals in the control, whereas we observed that large females and males have less fat reserves than the ones from the control.

Discussion

Our results indicated that the fitness traits we measured (longevity without food, egg load and lifetime fecundity) were positively correlated with body size in the control treatments, which confirms that in our model species, as in general in parasitoids, fitness is higher in the larger individuals. In contrast, after a 2 week cold stress, no relation was found in most of our treatments, regardless of temperature, meaning that larger individuals are more affected than the smaller ones by cold storage. In other words, we found that larger females had fewer eggs in their ovaries, oviposited less eggs in hosts and lived less without food in treatments 7C2 and 4C2 than in controls treatments. Larger males lived shorter in the treatment 7C2 only. For a shorter duration of stress (treatments C1), we observed intermediate results, showing that the energetic constraint increased with the stress duration. These results showed that the AED hypothesis applies best to this case. Large individuals, in constrained

conditions, need to use more energy to sustain their body functions and so they will suffer more (Blanckenhorn et al. 1995; Blanckenhorn 2005; Reim et al. 2006a). It is known that large individuals have larger organs, which are energetically costly to build and maintain (Suarez 1998). Consequently, small adults could be more adapted to cold stress than larger ones due to their smaller energy demand to sustain themselves, and consequently they may live longer and have better fecundity. These results are also confirmed by our previous study in the same species, indicating that after an extensive stress (4 weeks of storage at 0°C), only the smallest individuals survived and performed as well as the control individuals (unpublished data).

To try to explain why the larger individuals were more affected than smaller ones, we analysed the lipid reserves of newly emerged adults, to determine if the amount of lipids used to resist the cold storage stress was proportionally the same in large and small individuals. Our results showed that larger adults have significantly less lipid reserves than smaller ones in the treatments 7C2 and 4C2 when compared to control individuals. This implies that during the cold exposure larger nymphs consumed their reserves proportionally more than the smaller ones. This higher consumption rate may be related to the higher amount of energy needed by the larger nymphs to resist cold exposure, which is responsible for the decrease in fitness traits of the larger adults. This energy could be related to a higher rate of biological reparation during the stress for larger individuals. In submitting adult parasitoids to starvation, Rivero & West (2002) found that starved larger individuals consumed their lipid reserves more rapidly than starved smaller ones. Our results thereby confirm the importance of lipid availability in parasitoids. Indeed, it was demonstrated before that lipid availability was considered as a principal resource to support a variety of stresses (Djawdan, Rose & Bradley 1997; Djawdan et al. 1998).

In parasitoid adults that are unable to synthesize lipids (Visser et al. 2010), it was known that the limited lipid reserves are allocated among the fitness traits (Arrese & Soulages 2010). For example, females of *Asobara tabida* which have invested a larger amount of energy in egg load have a shorter lifespan than others (Ellers & van Alphen 1997). We observed that smaller females of the treatments 7C2 and 4C2 have a larger egg load at emergence than the control females, whereas they have approximately the same lifetime fecundity. Here, these small females invest more energy to produce and mature eggs to be used soon after emergence. We have previously shown that cold storage stress induced a reduced longevity (Ismail et al. 2010), it is probable that a stronger investment in fecundity at

the beginning of life is responsible to this potentially reduced longevity. In other words, in stressful environments, females invest their energy into early reproduction, and so changed their reproductive strategy from a synovigenic to a provigenic. Denis et al. (unpublished data) have developed a model showing that a stress inducing energy consumption (in their case an increase of temperature during adult life) should generate an increase of the ovovigeny index, meaning a larger investment in early fecundity. On the other hand, for larger females which suffer more from this stress, all fitness traits (longevity, egg load at emergence and lifetime fecundity) were reduced, and it is not possible to determine which trait is proportionally the most affected.

In parasitoid species, females are generally larger than males. It is well known that mothers choose larger hosts to oviposit eggs which will produce their daughters and smaller ones to oviposit eggs which will produce their sons (Charnov et al. 1981; Seidl & King 1993). Consequently, the larger size of females is generally due to a larger amount of energy reserves, and males thereby require less energy to maintain their activities. *Aphidius ervi* is a synovigenic species, meaning that females mature new eggs after emergence. It is probable that producing eggs for females is more expensive energetically than producing sperms for males (Ernsting & Isaaks 2002). This could explain why we observed that larger female longevity was more damaged than that of larger males.

To conclude, larger individuals were significantly more affected than the smaller ones by cold stress. We found that the proportionally stronger decrease in lipid reserves of the emerged larger adults is probably the most important factor responsible for the reduction in fitness traits in the larger adults. In contrast, we found that the smaller females changed their reproductive behaviour by increasing their fecundity at the beginning of their lives. These results could have consequences in biological control programmes. Indeed, to be an effective biological control agent, the parasitoids after cold storage have to meet several requirements regarding quantity, quality, and possibility of being efficient for inundative releases.

Here, no significant mortality was found after two weeks of cold storage, but the emerging large individuals presented a reduced fitness, whereas the emerging small individuals presented an earlier reproduction than control ones.

Acknowledgements

This study was supported by a scholarship from the Syrian Ministry of Higher Education, and funded by the UMR 6553 CNRS Ecobio (University of Rennes1). We thank Viridaxis S.A. in Belgium for providing *A. ervi*. We are grateful to Damien Denis for helpful comments on an earlier version of the manuscript. We also thank Sonia Dourlot for the picture of *A. ervi*.

References

- Andersson, M. (1994) *Sexual Selection*. Princeton Univ. Press, Princeton, NJ.
- Angilletta, M.J., Steury, T.D. & Sears, M.W. (2004) Temperature, growth rate, and body size in ectotherms: Fitting pieces of a life-history puzzle. *Integrative and Comparative Biology* **44**, 498-509.
- Arnett, A.E. & Gotelli, N.J. (2003) Bergmann's rule in larval ant lions: testing the starvation resistance hypothesis. *Ecological Entomology* **28**, 645-650.
- Arrese, E.L. & Soulages, J.L. (2010) Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *Annual Review of Entomology* **55**, 207-25.
- Bennett, D.M. & Hoffmann, A.A. (1998) Effects of size and fluctuating asymmetry on field fitness of the parasitoid *Trichogramma carverae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Journal of Animal Ecology* **67**, 580-591.
- Blanckenhorn, W.U. (2000) The evolution of body size: What keeps organisms small? *Quarterly Review of Biology* **75**, 385-407.
- Blanckenhorn, W.U. (2005) Behavioral causes and consequences of sexual size dimorphism. *Ethology* **111**, 977-1016.
- Blanckenhorn, W.U., Birrer, M., Meier, C.M., Reim, C., Teuschl, Y. & Weibel, D. (2008) Size-dependent mating success at various nutritional states in the yellow dung fly. *Ethology* **114**, 752-759.
- Blanckenhorn, W.U., Fanti, J. & Reim, C. (2007) Size-dependent energy reserves, energy utilization and longevity in the yellow dung fly. *Physiological Entomology* **32**, 372-381.
- Blanckenhorn, W.U., Preziosi, R.F. & Fairbairn, D.J. (1995) Time and energy constraints and the evolution of sexual size dimorphism - to eat or to mate. *Evolutionary Ecology* **9**, 369-381.
- Bokma, F. (2004) Evidence against universal metabolic allometry. *Functional Ecology* **18**, 184-187.
- Calder, W.A. (1984) *Size, Function, and Life History*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Charnov, E.L., Losdenhartogh, R.L., Jones, W.T. & van denasse, J. (1981) Sex ratio evolution in a variable environment. *Nature* **289**, 27-33
- Chown, S.L. & Gaston, K.J. (2010) Body size variation in insects: a macroecological perspective. *Biological Reviews* **85**, 139-169.

- Colinet, H., Hance, T. & Vernon, P. (2006a) Water relations, fat reserves, survival, and longevity of a cold-exposed parasitic wasp *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Aphidiinae). *Environmental Entomology* **35**, 228-236.
- Colinet, H., Renault, D., Hance, T. & Vernon, P. (2006b) The impact of fluctuating thermal regimes on the survival of a cold-exposed parasitic wasp, *Aphidius colemani*. *Physiological Entomology* **31**, 234-240.
- Colinet H., Vernon P. & Hance T. (2007). Does thermal-related plasticity in size and fat reserves influence supercooling abilities and cold-tolerance in *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Aphidiinae) mummies? *Journal of Thermal Biology* **32**, 374-382.
- Cushman, J.H., Lawton, J.H. & Manly, B.F.J. (1993) Latitudinal patterns in European ant assemblages: variation in species richness and body size. *Oecologia*, **95**, 30-37.
- Denis, D., Pierre, J.S., van Baaren, J. & van Alphen, J.J.M. How sudden temperature increase events and habitat quality affect parasitoids lifetime reproductive success. Ecological modelling Submitted.
- Djawdan, M., Chippindale, A.K., Rose, M.R. & Bradley, T.J. (1998) Metabolic reserves and evolved stress resistance in *Drosophila melanogaster*. *Physiological Zoology* **71**, 584-594.
- Djawdan, M., Rose, M.R. & Bradley, T.J. (1997) Does selection for stress resistance lower metabolic rate? *Ecology* **78**, 828-837.
- Doyon, J. & Boivin, G. (2005) The effect of development time on the fitness of female *Trichogramma evanescens*. *Journal of insect Science* **5:4**.
- Ellers, J. (1996) Fat and eggs: An alternative method to measure the trade-off between survival and reproduction in insect parasitoids. *Netherlands Journal of Zoology* **46**, 227-235.
- Ellers, J., van Alphen, J.J.M. & Sevenster, J.G. (1998) A field study of size-fitness relationships in the parasitoid *Asobara tabida*. *Journal of Animal Ecology* **67**, 318-324.
- Ellers, J. & Vanalphen, J.J.M. (1997) Life history evolution in *Asobara tabida*: plasticity in allocation of fat reserves to survival and reproduction. *Journal of Evolutionary Biology* **10**, 771-785.
- Ernsting, G. & Isaaks, J.A. (2002) Gamete production and sexual size dimorphism in an insect (*Orchesella cincta*) with indeterminate growth. *Ecological Entomology* **27**, 145-151.
- Gillooly, J.F., Brown, J.H., West, G.B., Savage, V.M., & Charnov, E.L. (2001) Effects of size and temperature on metabolic rate. *Science* **293**, 2248-2251.
- Glazier, D.S. (2005) Beyond the '3/4-power law': variation in the intra- and interspecific

- scaling of metabolic rate in animals. *Biological Reviews* **80**, 611-662.
- Godfray, H.C.J. (1994). *Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology*. Princeton University Press, Princeton.
- Ismail, M., Vernon, P., Hance, T. & van Baaren, J. Stress intensity and fitness: low temperature combined with fluctuating regime is a must. In preparation.
- Ismail, M., Vernon, P., Hance, T. & van Baaren, J. (2010) Physiological costs of cold exposure on the parasitoid *Aphidius ervi*, without selection pressure and under constant or fluctuating temperatures. *BioControl* **55**, 729-740.
- Lehmann, F.O., Dickinson, M.H. & Staunton, J. (2000) The scaling of carbon dioxide release and respiratory water loss in flying fruit flies (*Drosophila* spp.). *Journal of Experimental Biology* **203**, 1613-1624.
- Le Ralec, A. (1991) *Les hyménoptères parasitoïdes : Adaptations de l'appareil reproducteur femelle. Morphologie et ultrastructure de l'ovaire, de l'œuf et de l'ovipositeur*. Thèse de Doctorat, Université de Rennes 1,
- Levie, A., Vernon, P. & Hance, T. (2005) Consequences of acclimation on survival and reproductive capacities of cold-stored mummies of *Aphidius rhopalosiphii* (Hymenoptera: Aphidiinae). *Journal of Economic Entomology* **98**, 704–708.
- March, P.M. (1977) Notes on the taxonomy and nomenclature of *Aphidius* species (Hymenoptera: Aphididae) parasitic on the pea aphid in North America. *Entomophaga* **22**, 365-372.
- Olson, D.M., Fadamiro, H., Lundgren, J.G. & Heimpel, G.E. (2000) Effects of sugar feeding on carbohydrate and lipid metabolism in a parasitoid wasp. *Physiological Entomology* **25**, 17-26.
- Reim, C., Teuschl, Y. & Blanckenhorn, W.U. (2006a) Size-dependent effects of larval and adult food availability on reproductive energy allocation in the Yellow Dung Fly. *Functional Ecology* **20**, 1012-1021.
- Reim, C., Teuschl, Y. & Blanckenhorn, W.U. (2006b) Size-dependent effects of temperature and food stress on energy reserves and starvation resistance in yellow dung flies. *Evolutionary Ecology Research* **8**, 1215-1234.
- Renault, D., Hance, T., Vannier, G. & Vernon, P. (2003) Is body size an influential parameter in determining the duration of survival at low temperatures in *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae)? *Journal of Zoology* **259**, 381-388.
- Rivero, A. & West, S.A. (2002) The physiological costs of being small in a parasitic wasp. *Evolutionary Ecology Research* **4**, 407-420.

- Rivero, A. & West, S.A. (2005) The costs and benefits of host feeding in parasitoids. *Animal Behaviour* **69**, 1293-1301.
- Sagarra, L.A., Vincent, C. & Stewart, R.K. (2001) Body size as an indicator of parasitoid quality in male and female *Anagyrus kamali* (Hymenoptera: Encyrtidae). *Bulletin of Entomological Research* **91**, 363–367.
- Savage, V.M., Allen, A.P., Brown, J.H., Gillooly, J.F., Herman, A.B., Woodruff, W.H. & West, G.B. (2007) Scaling of number, size, and metabolic rate of cells with body size in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 4718-4723.
- Seidl, S.E. & King, B. (1993) Sex-ratio manipulation by the parasitoid wasp *muscidifurax raptor* in response to host size. *Evolution* **47**, 1876-1882.
- Sequeira, R. & Mackauer, M. (1992) Covariance of adult size and development time in the parasitoid wasp *Aphidius ervi* in relation to the size of its host, *Acyrtosiphon pisum*. *Evolutionary Ecology* **6**, 34-44.
- Sigsgaard, L. (2000) The temperature-dependent duration of development and parasitism of three cereal aphid parasitoids, *Aphidius ervi*, *A. rhopalosiphi* and *Praon volucre*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **95**, 173-184.
- Starý, P. (1978) Seasonal relations between lucerne, red clover, wheat and barley agroecosystems through the aphids and parasitoids (Homoptera Aphididae; Hymenoptera, Aphidiidae). *Acta Entomologica Bohemoslovaca* **75**, 296–311.
- Stilmant, D., van Bellinghen, C., Hance, T. & Boivin, G. (2008) Host specialization in habitat specialists and generalists. *Oecologia* **156**, 905-912.
- Stearns, S.C. (1992) *The Evolution of Life Histories*. Oxford: Oxford University Press.
- Suarez, R.K. (1998) Oxygen and the upper limits to animal design and performance. *The Journal of Experimental Biology* **201**, 1065–1072.
- Vernon, P. & Vannier, G. (1996) Developmental patterns of supercooling capacity in a subantarctic wingless fly. *Experientia* **52**, 155-158.
- Visser, B., Le Lann, C., Den Blanken, F.J., Harvey, J.A., van Alphen, J.J.M. & Ellers, J. (2010) Loss of lipid synthesis as an evolutionary consequence of a parasitic lifestyle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 8677-8682.
- Visser, M.E. (1994) The importance of being large - the relationship between size and fitness in females of the parasitoid *Aphaereta minuta* (Hymenoptera, Braconidae). *Journal of Animal Ecology* **63**, 963-978.

- West, S.A., Flanagan, K.E. & Godfray, H.C.J. (1996) The relationship between parasitoid size and fitness in the field, a study of *Achrysocharoides zwoelferi* (Hymenoptera: Eulophidae). *Journal of Animal Ecology* **65**, 631-639.
- Wikelski, M., Carrillo, V. & Trillmich, F. (1997) Energy limits to body size in a grazing reptile, the Galapagos marine iguana. *Ecology* **78**, 2204-2217.

Table 1. Multiple comparisons (2 by 2) were done by the function compslope (bonferroni, $p = 0.005$).

Egg load			
Slope 1	Slope 2	t	p value
Cntrl	7C1	0.347	0.365
Cntrl	7C2	3.061	0.001*
Cntrl	4C1	0.381	0.352
Cntrl	4C2	3.254	0.001*
7C1	7C2	3.046	0.001*
7C1	4C1	0.064	0.475
7C1	4C2	3.287	0.001*
7C2	4C1	2.775	0.003*
7C2	4C2	0.009	0.497
4C1	4C2	2.964	0.002*

Table 2. Multiple comparisons (2 by 2) for female and male lipid reserves, were done by the function `compslope` (bonferroni, $p = 0.02$).

		Female lipid reserves		Male lipid reserves	
Slope 1	Slope 2	T	p value	t	p value
Cntrl	7C1	0.285	0.39	2.116	0.02
Cntrl	7C2	1.859	0.01*	3.547	< 0.001***
7C1	7C2	2.196	0.01*	1.159	0.12

Figure legends

Figure 1. Regression of size with longevity for both sexes: females (Cntrl: $y = -5.46 + 14.02 \text{ size}$) and males (Cntrl: $y = -4.79 + 13.67 \text{ size}$). a: females at 7°C (C1: $y = -3.58 + 10.03 \text{ size}$, 7C2: $y = -0.47 + 4.28 \text{ size}$), b: females at 4°C (C1: $y = -1.15 + 6.51 \text{ size}$, C2: $y = 1.25 + 1.21 \text{ size}$). c: males at 7°C (C1: $y = -2.42 + 9.39 \text{ size}$, C2: $y = -1.43 + 7.10 \text{ size}$). d: males at 4°C (C1: $y = -3.438 + 11.15 \text{ size}$, C2: $y = -1.69 + 7.75 \text{ size}$).

Figure 2. Regression of size with egg load at emergence (Cntrl: $y = -131.65 + 354.03 \text{ size}$) and life time fecundity (Cntrl: $y = -190.01 + 426.65 \text{ size}$). a: egg load at 7°C (C1: $y = -109.74 + 306.08 \text{ size}$, C2: $y = 52.51 + 31.14 \text{ size}$). b: egg load at 4°C (C1: $y = -136.17 + 342.79 \text{ size}$, C2: $y = 84.99 - 24.11 \text{ size}$). (a) 7C1: $y = -109.74 + 306.08 \text{ size}$, 7C2: $y = 52.51 + 31.14 \text{ size}$. (b) 4C1: $y = -136.17 + 342.79 \text{ size}$, 4C2: $y = 84.99 - 24.11 \text{ size}$). c: life time fecundity at 7°C (C1: $y = -122.15 + 290.71 \text{ size}$, C2: $y = -16.19 + 119.61 \text{ size}$). d: life time fecundity at 4°C (C1: $y = -197.48 + 443.34 \text{ size}$, C2: $y = -110.21 + 278.75 \text{ size}$).

Figure 3. Regression of lipid reserves with body mass for both sexes. Female (Cntrl: $y = -0.008 + 0.672 \text{ body mass}$, 7C1: $y = -0.014 + 0.735 \text{ body mass}$, 7C2: $y = 0.008 + 0.158 \text{ body mass}$). Male (Cntrl: $y = -0.011 + 0.907 \text{ body mass}$, 7C1: $y = -0.004 + 0.556 \text{ body mass}$, and 7C2: $y = 0.004 + 0.285 \text{ body mass}$).

Figure 1.

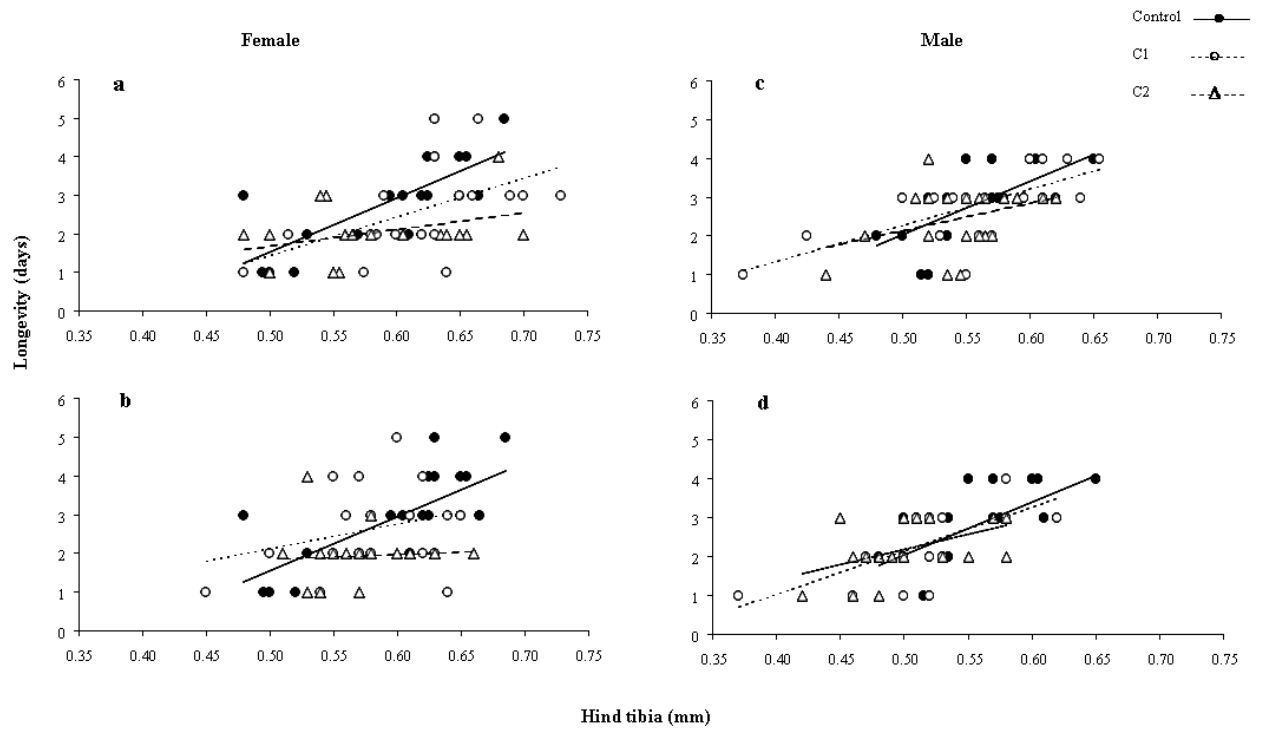


Figure 2.

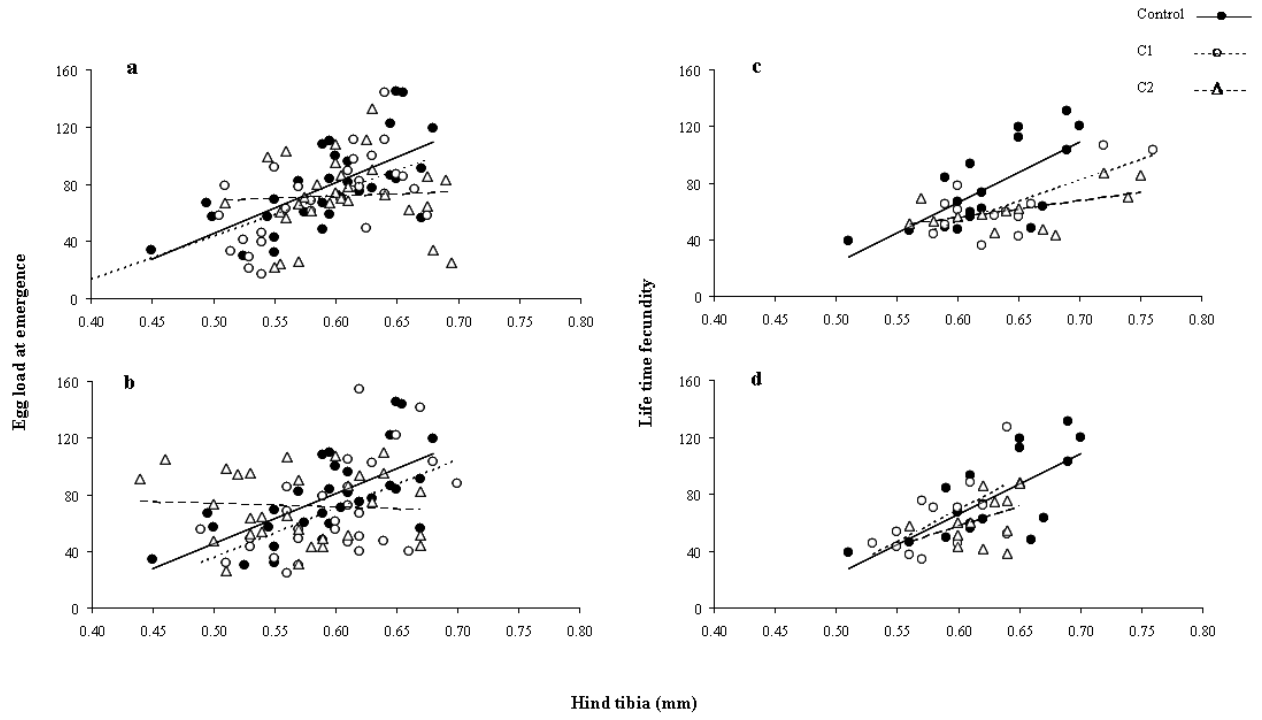
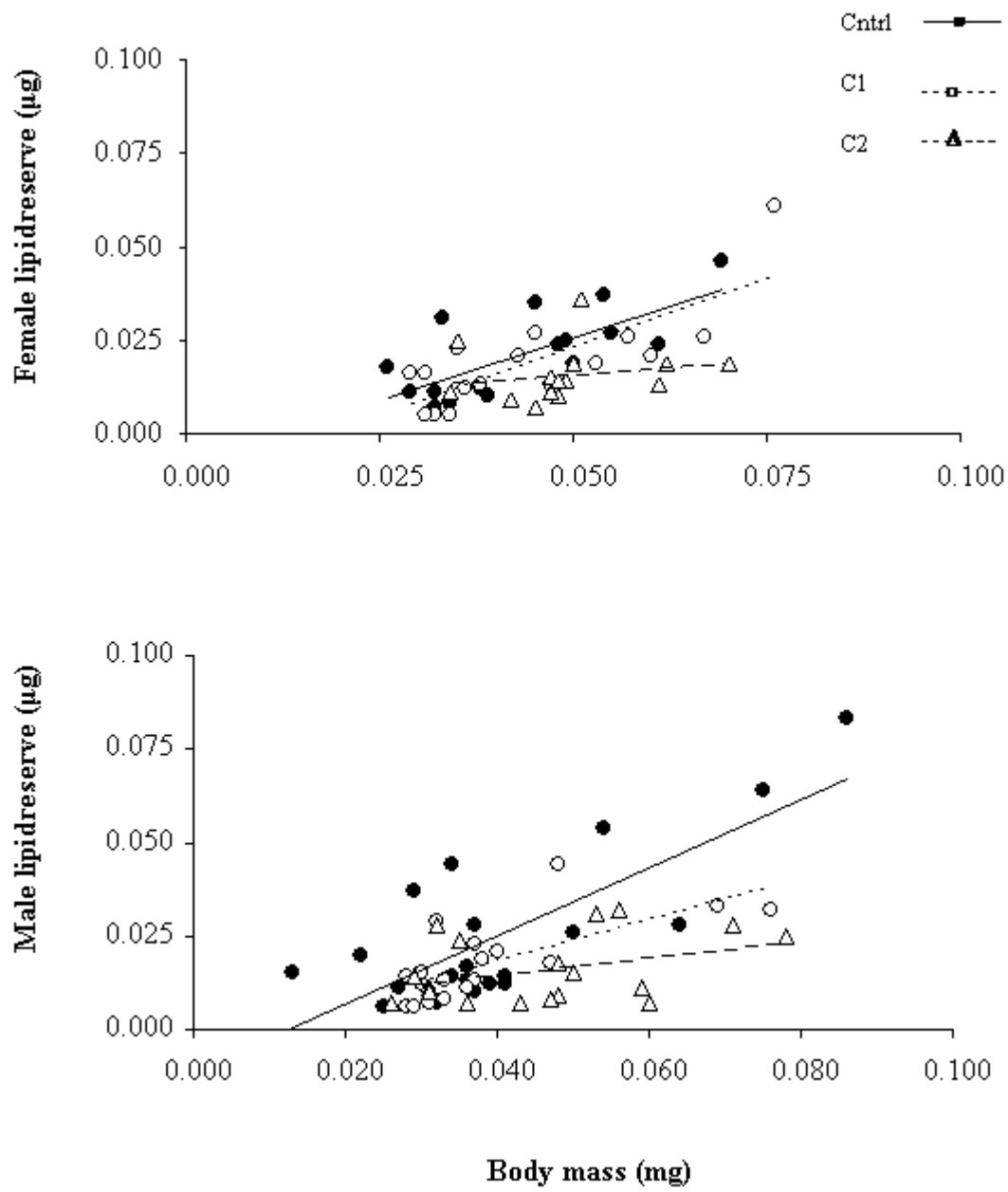


Figure 3.



Chapitre 5

The effect of different treatments of cold storage on the growth rate of *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae)

Mohannad Ismail, Joan van Baaren, Jean-Sébastien Pierre, Philippe Vernon, and Thierry Hance

Submitted in Biological control

The effect of different treatments of cold storage on the growth rate of *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae)

Mohannad Ismail^{1,3}, Joan van Baaren¹, Jean-Sébastien Pierre¹, Philippe Vernon², and Thierry Hance³

1 Université de Rennes 1, UMR 6553 CNRS - EcoBio, France.

2 Université de Rennes 1, Station Biologique de Paimpont, UMR 6553 CNRS - EcoBio, France.

3 Université catholique de Louvain. Earth and life Institute, Biodiversity Research Centre, Place Croix du Sud, 4-5, 1348, Louvain-la-Neuve, Belgique.

UMR-CNRS 6553 Ecobio, Université de Rennes 1

263 Avenue du Général Leclerc

CS74205

35042 Rennes Cedex

France

Phone: 33 (0) 2 23 23 51 39.

Fax : 33 (0) 2 23 23 50 26.

E-mail: mohannad.ismail@univ-rennes1.fr

mohannadsyr@hotmail.fr

Résumé

La température joue un rôle majeur dans la détermination du potentiel démographique chez les insectes ectothermes. Toutefois, peu d'informations sont connues concernant les conséquences de l'exposition au froid sur les traits démographiques. Cela est particulièrement important pour les parasitoïdes utilisés en lutte biologique qui sont stockés avant les lâchers inondatifs.

Dans cet article, nous avons analysé les paramètres démographiques d'*Aphidius ervi* après le stockage au froid des momies à trois températures (7, 4, et à 0°C), combiné avec deux durées de stockage (1 et 2 semaines), et deux régimes thermiques (fluctuant ou constant), ce qui représente un total de 12 traitements et le témoin.

Nos résultats montrent que le traitement constant après une semaine à 0°C est le plus favorable pour stocker des momies, car il produit le nombre maximum de femelles dans la génération suivant le stockage. Les autres traitements présentent une diminution significative du taux net de reproduction (R_0), de la fécondité cumulée et du sex-ratio (augmentation de la proportion de mâles). Les traitements fluctuants présentent des valeurs intermédiaires entre le témoin et les traitements constants à 7 et 4°C.

Mot-clés: *Aphidius ervi*, fécondité cumulée, taux d'accroissement, taux net de reproduction, sexe ratio

Abstract

In ectotherm insects, temperature plays a major role in determining the demographic potential. However, little is known about the consequences of a limited period of cold exposure on the main demographic traits. This is particularly important for parasitoids which are cold stored before inundative releases. In this paper, we analysed the main instantaneous demographic parameters of *Aphidius ervi* when exposed to three storage temperatures at the mummy stage, 7, 4, and 0°C, combined with two storage durations (1 and 2 weeks), and two thermal regimes (fluctuating or constant) which represents a total of 12 treatments and a control.

Surprisingly the exposure at 0°C during one week presented values of fitness traits for the emerging individuals similar to those of the control individuals and better than for individuals of all other treatments. For these individuals, a significant decrease in the net reproductive rate (R_0), the cumulative fecundity values and the sex ratio of progeny of females that emerged from cold stored mummies was observed, even if this decrease was less marked for individuals submitted to the fluctuating treatments. These results allow comparing the different treatments regarding their consequences for biological control efficiency.

Keywords: *Aphidius ervi*, cumulative fecundity, growth rate, net reproductive rate, sex ratio.

1. Introduction

Demographic studies bring fundamental results on population size, age distribution, and pattern of growth but also enlighten other biology traits such as genetic structure, behaviour, and ecology (Chi, 1988). These studies provide a comprehensive illustration of the survival, development time, longevity of adults, and the reproduction capabilities of each female under different conditions (Yang and Chi, 2006). Demographic analysis of various life history parameters has been applied in studies on a variety of organisms including a large number of insect species (Blanco et al., 2009; Chi, 1988), and the natural enemies of agricultural pests (Atlihan and Chi, 2008; Chen et al., 2008b; Chi and Su, 2006). They allow growth prediction based on population models (Carey, 1993) and may help to forecast the effectiveness of a parasitoid in the field (Ehler, 1990) and interactions with other insect pests and natural enemies (Omer et al., 1996). Demographic parameters are known to be influenced by several factors such as temperature (Chen et al., 2008b; Omer et al., 1996), host-plant (van Impe and Hance, 1993), host-insect (Amir-Maafi and Chi, 2006; Dias et al., 2010), or by using artificial diets (Blanco et al., 2009). Considering studies on temperature effect, they are currently linked to constant exposure during the entire life of an insect. Little data are available in the literature on the consequences of cold exposure during a part of the insect development on the future potential growth of the population in the first generation G1. However, this is particularly important for insect parasitoids that are cold stored during their nymphal instar.

Indeed, in inundative biological control programmes, to be able to produce large amounts of parasitoids for mass release when the target pest is present, insectaries currently used cold storage of natural enemies. This cold exposition may alter fitness components of the stored individuals and thus their efficiency for biological control (Atlihan and Chi, 2008; Levie et al., 2005). Consequences on mortality (Lopez and Botto, 2005) and negative effects on the following life history traits have been described: longevity (Colinet et al., 2006a), fecundity (Pitcher et al., 2002), sex ratios (Ismail et al., 2010), female and male sterility (Levie et al., 2005), flight ability, which affects dispersal (Couillien and Gregoire, 1994; Luczynski et al., 2007). Generally, negative effects of cold storage on the life history traits increase with decreasing storage temperature (Lopez and Botto, 2005), and with increasing storage duration (Rundle et al., 2004). However, measuring such fitness traits does not allow evaluating what should be the consequences of the parasitoid cold exposure on their efficiency to produce a first generation on the pest population.

In our study, we compared among different cold storage treatments at the nymphal stage inside the mummy on demographic parameters of the parasitoid *Aphidius ervi*. Mummies were exposed to three temperatures, above and below the development threshold (T_0), with a combination of two durations of storage and two thermal regimes (constant and fluctuating). It was shown that fluctuating temperatures, i.e. a cold period interrupted by a return to a higher temperature for a short time (Leopold et al., 1998), improved survival and the performances that are affected under storage at constant treatments (Colinet et al., 2006b; Ismail et al., 2010). The objective of this study is to evaluate the appropriate parameter that could allow a good comparison of different treatments of cold storage on the growth rate of a population.

2. Materials and methods

The parasitoid *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae) was chosen as a model as it is commercially produced and widely distributed in several European countries for inundative releases. It is a common cosmopolitan solitary endo-parasitoid (Marsh, 1977) of several aphid species of economically important crops such as legumes and cereals (Starý, 1978; Stilmant et al., 2008). *A. ervi* was provided by Viridaxis S.A. in Belgium. It was reared on the SA1 clone (INRA collection) of the grain aphid *Sitobion avenae* Fabricius (Homoptera: Aphididae) which was collected from wheat crops around Rennes in France in 1990. The aphids were reared under laboratory conditions in small pots of wheat (*Triticum aestivum* L, cv. Boston). Parasitoids and hosts have been maintained in Plexiglas cages (50 × 50 × 50 cm) in climate rooms at 20 ± 1 °C, $60 \pm 10\%$ RH with a photoperiod 16L: 8D. *Aphidius ervi* was reared for three generations before the experiments.

100 one-day-old mummies of *A. ervi* were randomly assigned to the control at 20°C and to three storage temperatures at 7, 4, and 0°C above and below the mummy-adult development threshold, which is $T_0 = 6.6$ °C for *A. ervi* (Sigsgaard, 2000). Two durations were used to store the mummies: 1 or 2 weeks, under two thermal regimes: constant storage temperature (C), or fluctuating storage temperature (F). For the fluctuating treatments a daily interruption of 2 hours at 20°C was practiced as described by Colinet et al., (2006b). We had thus a control and 12 treatments consisting of combinations of three factors (temperature, duration, and thermal regime): control at 20°C; 7C1, 4C1 and 0C1: constant temperatures, for 1 wk at (7, 4 and 0°C respectively); 7C2, 4C2 and 0C2: constant temperatures for 2 wks.; 7F1, 4F1 and 0F1: fluctuating temperature for 1 wk 7F2, 4F2 and 0F2: fluctuating temperature for 2 wks.

For all treatments, mummies were progressively acclimated by exposing them from 20°C to the low temperature by steps of 2 hours (for 7°C: 2h at 17, 14 and 11°C; 4°C : 2h at 16, 12 and 8°C; 0°C : 2h at 15, 10 and 5°C) (Levie et al., 2005). They were then kept in a thermo-regulated Sanyo incubator (Electric Co. Ltd, Japan) with a thermal precision of $\pm 1^\circ\text{C}$, under a photoperiod 16L: 8D. After cold storage, mummies were transferred to 20°C using the same progressive temperature raise than for cold exposure. To avoid an incubator effect, the incubators used for each treatment were regularly permuted.

2.1. Emergence rate

The emergence rate was measured by placing 100 mummies per treatment individually in a small gelatin capsules ($\text{Ø} = 0.5 \text{ cm}$, $L = 1.5 \text{ cm}$). Adult emergence rate was expressed as the number of individuals which emerged from mummies.

2.2. Demographic parameters

To evaluate the demographic parameters, one-day-old females mated with a male from the same treatment were transferred to small pots containing a wheat plant with about 100 aphids of 3rd and 4th larval instars. Since females usually lay their eggs at the beginning of their life, these pots were renewed every day during the five first days and then 1 time every 3 days until the death of the female. The females were provided with honey *ad libitum*. This experiment was carried out at $20 \pm 1^\circ\text{C}$ with a 16L: 8D photoperiod. Moreover, the mortality of these females was checked daily from the first day of the experiment to their death. Daily fecundity was evaluated by counting the number of mummies obtained. These mummies of the G1 generation were placed in a plastic Petri dish until emergence to determine the sex ratio of the progeny (female proportion was taken in account).

The following parameters were measured: development time (from oviposition to adult eclosion), survival, female fecundity (number of females produced per female), sex ratio and female longevity. We also calculated the cumulative fecundity from the female fecundity. To evaluate the effect of low temperatures on demographic parameters, we followed parasitoid eggs from their laying by females that underwent the cold exposure until mummies production, and then we analysed the emergence rate of these G1 females and their fecundity and survival. Since the duration storage is an artificial period, we did not therefore take it into account when calculating the precedent parameters. However, as the development is not completely stopped during the storage, especially in the fluctuating treatments and at the temperature of 4 and 7°C, the development time after storage is reduced.

The generation time (**Tc**) was calculated as the mean interval separating the birth of one generation from the birth of the next one, as: $Tc = \frac{\sum l_x \cdot m_x \cdot x}{\sum l_x \cdot m_x}$. The net reproductive rate **R₀**, represented the mean number of female offspring produced by each female during its entire life (Birch, 1948; Carey, 1993). It was calculated as: $R_0 = \sum l_x \cdot m_x$, where **l_x** is the probability of an individual to reach the age **x**, and **m_x** is the number of females produced per female of age **x**. The cumulative fecundities were fitted to a logistic curve using the DUD method (Does not Use Derivative, Raltson and Jennrich, 1978; Kennedy and Hance, 1995; van Impe and Hance, 1993). To estimate the average life time fecundity and fertility per female, we calculated the net fecundity as $\sum l_x \cdot M_x$ where **M_x** is the number of offspring (male and female) produced by female at age **x**. The net fertility is calculated as $\sum l_x \cdot h_x \cdot M_x$ Where **h_x** is the hatching rate at age **x**.

The intrinsic rate of increase (**r_m**), was determined from survival and reproduction by substituting trial values of **r_m** based on life fecundity tables constructed using Lotka's equation (Birch, 1948; Carey, 1993): $\sum l_x \cdot m_x \cdot e^{-rx} = 1$. The intrinsic rate of increase was then used to calculate the finite rate of increase: $\lambda = e^{r_m}$. We used the jack-knife technique to estimate mean demographic parameters of **l_x·m_x** of the life table and the standard errors (SE), as previously used by Meyer et al., (1986), and Chen et al., (2008). The Jackknife analysis method removes one observation at a time from the original data set and recalculates the statistic of interest from the truncated data set as follow: $r_i = n \cdot r_{all} - (n-1) \cdot r_i$. The values of **r** for each female at each temperature were calculated by using the software Microsoft excel. The method can estimate **R₀**, **Tc**, **r_m**, with their respective jack-knife variances.

2.3. Statistical analyses

The emergence rates were compared among treatments using a χ^2 test. The Cox Proportional Hazard Model was used to compare female longevity with temperature, storage duration, and thermal regime as fixed factors. Variance analyses (Anova3) was used to compare the **Tc**, **R₀**, **r_m**, and sex ratio with temperature, storage duration, and thermal regime as fixed factors, and followed by Bonferroni's post hoc multiple comparison tests when needed ($\alpha = 0.05 k^{-1}$, where **k** is the comparison number). The **Tc**, **R₀** data were arcsine square root transformed. Data are presented as mean \pm SE. Statistical analyses were done using the statistical package R version 2.8.0 (R Development Core Team, 2008).

Since the cumulative fecundity (No of females in the progeny) related to female age has a sigmoid distribution in all treatments, we used the DUD method (Raltson and Jennrich, 1978), according to the following equation: $Y = \frac{K}{1 + e^z}$, where $z = -(x - a)/b$, **y** represents

the value of the cumulative fecundity at age x , K is the maximum number of individuals (plateau value), a is the inflexion point, b is the inverse of the slope. The equation represents the total number of female progeny produced in one generation by an adult female. The DUD method fits the data to a sigmoid function, and allowed the calculation of a confidence interval (95%) on each K , a and b parameters. We assumed that values were significantly different when confidence intervals did not overlap (Hance et al., 1994; Kennedy and Hance, 1995; van Impe and Hance, 1993). The method was analysed by using GraphPad Prism version 5.01 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA (<http://www.graphpad.com>).

3. Results

3.1. Emergence rate

The emergence rate of *A. ervi* did not change whatever the thermal treatment and the storage temperature used compared to the control at 20°C ($\chi^2_8 = 0.39$; $p = 0.999$) (Table 1).

3.2. Demographic growth parameters

Table (1) present the demographic parameters of *A. ervi*, estimated by the Jackknife analysis of $\mathbf{l}_x, \mathbf{m}_x$ life table data at three storage temperatures under 2 storage durations and combined with two thermal regimes. Significant differences between the parameters among the different treatments were presented in Table 2.

Female survival and fecundity parameters

Female survival during lifetime fecundity did not change significantly for all treatments comparing to the control considering the storage temperature ($\chi^2_3 = 1.48$; $p = 0.22$), the exposure duration ($\chi^2_1 = 0.18$; $p = 0.67$) or the thermal regime ($\chi^2_1 = 0.10$; $p = 0.74$). There was an interaction among all these factors ($\chi^2_2 = 3.41$; $p = 0.03$).

The R_0 of the G1 decreased significantly for the 7 and 4°C storage temperatures ($F_{3,133} = 222.45$; $p < 0.001$) but not at 0°C. We found also that both durations after 1 and 2 weeks of storage affected negatively the R_0 value ($F_{1,133} = 129.81$; $p < 0.001$). A significantly higher R_0 was found under the fluctuating regimes compared to the constant ones ($F_{1,133} = 528.51$; $p < 0.001$). The interaction among factors was significant ($F_{2,133} = 73.16$; $p < 0.001$). All tested females produced offspring after the storage excepted one in the treatment 4C2.

The net fecundity rate per female measured showed a significant decrease at 7 and 4°C ($F_{3,133} = 183.98$; $p < 0.001$), and by the duration after 1 and 2 weeks of storage ($F_{1,133} = 308.82$; $p <$

0.001). Significant higher values were obtained under the fluctuating comparing to the constant regimes ($F_{1,133} = 246.18$; $p < 0.001$). An interaction was found among the tested factors ($F_{2,133} = 125.82$; $p < 0.001$). Likewise, the net fertility rate per female decreased significantly at all storage temperatures ($F_{3,133} = 142.39$; $p < 0.001$), and by the duration after 1 and 2 weeks of storage ($F_{1,133} = 231.79$; $p < 0.001$). A significant higher value was found under the fluctuating comparing to the constant regimes ($F_{1,133} = 252.92$; $p < 0.001$). A significant interaction was found among the tested factors ($F_{2,133} = 62.73$; $p < 0.001$).

The analysis of cumulative fecundity using the DUD method comparing the sigmoid curves (Fig. 1) presented significant differences among treatments ($F_{36,1108} = 309.40$; $p < 0.001$) (Table 3), the better results being surprisingly obtained under 0°C for one week duration of storage.

The sex ratio (proportion of females) did not decrease significantly according to the storage temperature ($F_{3,133} = 2.25$; $p = 0.09$), but it decreased with duration especially after 2 weeks of storage ($F_{1,133} = 4.08$; $p = 0.02$). A significantly higher sex ratio was found under the fluctuating regimes compared to the constant ones ($F_{1,133} = 6.57$; $p = 0.01$). There was no interaction among the factors ($F_{2,133} = 1.05$; $p < 0.35$) and the sex ratio of the progeny showed the same trend in all treatments (Fig. 2).

The mean generation time (T_c)

The development continues during the storage in particular at 7 and 4°C and in the fluctuating regimes. The T_c decreased thereby significantly under storage temperatures at 7 and 4°C compared to the control ($F_{3,133} = 6763.23$; $p < 0.001$) and according to both duration of storage ($F_{1,133} = 9983.05$; $p < 0.001$). It was also shorter under the fluctuating than the constant regimes ($F_{1,133} = 3902.52$; $p < 0.001$). The shortest generation time was under the treatment 7F2 where was 13.82 days comparing to 17.85 days at 20°C. There was an interaction among the three tested factors ($F_{2,133} = 310.49$; $p < 0.001$).

The intrinsic rate of increase (r_m)

The values of r_m did not vary significantly among the treatments with temperature ($F_{3,133} = 2.53$; $p = 0.06$), nor with the storage duration ($F_{1,133} = 2.99$; $p = 0.08$), but it increased under the fluctuating regimes compared to the constant ones ($F_{1,133} = 22.97$, $p < 0.001$). There was an interaction between the factors ($F_{2,133} = 0.81$, $p = 0.44$).

The finite rate of increase (λ)

This parameter is related directly to the value of r_m . There was no effect of storage temperature or duration on this parameter ($F_{3,133} = 2.41; p = 0.07$), ($F_{1,133} = 3.19; p = 0.08$) respectively, but it increased in the thermal regimes compared to the constant ones ($F_{1,133} = 22.52, p < 0.001$). There was an interaction between the factors ($F_{2,133} = 0.78, p = 0.46$).

4. Discussion

Our results showed that cold storage has important negative effects on fecundity parameters. In our case, cumulative fecundity did not vary in shape among the treatments, but it varied in the values of the K plateau. This variation is related to a significant decrease in R_0 in the generation G1. This means a constant decrease regarding age comparing to the control for all treatments. Indeed, the cumulative fecundity represents a good estimate of the impact of the treatments for the next generation growth as it takes into account the total number of female eggs laid (K), the way they are distributed across female lifetime and the female mortality. It has been suggested in previous studies that cumulative fecundity was a best way to estimate the growth rate for one generation on several species of mites on a variety of plants (Hance et al., 1998; Kennedy et al., 1996; van Impe and Hance, 1993). Indeed, it is a better indicator than the r_m value which is only applicable for a stable age population growth and thus do not represent the true impact on next generation (Carey, 1993; Kennedy and Hance, 1995). The use of r_m values is thus inappropriate to evaluate the implication of such treatments for mass release efficiency. We confirmed thereby that for one generation, it is more practical to estimate the cumulative fecundity parameters to evaluate the growth rate of a population in parasitoids. Another parameter affected by the cold storage is the offspring sex ratio, which presented the same kind of distribution with female age in all treatments, with a significant decrease in female proportion among the treatments. This is probably related to a decrease in sperm availability in the spermatheca due to cumulated eggs fertilization (Bressac and Chevrier, 1998). Sex ratio affects also population growth as it conditions the number of females in the population, and is thus one of the factors that potentially affect the success or failure of released parasitoids in biological control (Mahmoudi et al., 2010; Waage, 1986).

We found that growth rate of *A. ervi* decreased after storage under 7 and 4°C conditions, and with increasing storage duration in particular under constant regimes. It was well demonstrated that a decreasing temperature and an increasing duration of cold exposure affect negatively the fitness traits in many species of parasitoids (Lopez and Botto, 2005; Rundle et

al., 2004). This is related to the cumulative damages that increased with duration and to indirect chilling injury (Chen et al., 2008a; Chen et al., 2008b; Leopold, 1998). On the other hand, only a few studies measured the demographic parameters after cold storage. For instance, Chen et al. (2008a,b) investigated the possibility of the parasitoid *Gonatocerus ashmeadi* storage using a fluctuating temperature (4.5, 6, and 7.2°C). They showed that growth rate (in these studies r_m was taken into the account) of *G. ashmeadi* begin to be affected after 20 days of storage.

Adults emerged earlier after storage in particular under the two temperatures at 7 and 4°C, because of that development is going on, even if slowly. Adults emerged earlier also after 2 weeks of storage especially under fluctuating regime. The daily interruption of 2 hours at 20°C will accelerate the development compared to the constant regime. This difference of emergence pattern through time must be taken into account for a mass release program in order to avoid a precocious emergence of adults during shipment and field application.

Our results showed surprisingly that the treatment 0°C 1 week was ideal for *Aphidius* cold storage. The positive effect of 0°C compared to other temperatures could be related to the metabolism of nymphs which is probably well slowed down to a minimum or even completely stopped at 0°C without chill damage as long as exposure duration do not exceed 1 week. In that case, the avoidance of any fat or sugar reserve depletion can explain a better resistance to cold stress (Hoffmann and Parsons, 1989). This observation confirms our previous results showing that emerged individuals after 4 weeks of exposure at 0°C, performed as well as no treated individuals (Ismail et al., In preparation).

The combination of stressful low temperatures and fluctuating regimes reduce the negative effects that appeared under constant regimes. A repairing action in the fluctuating regimes could probably explain these results (Leopold et al., 1998). Previous studies have mentioned the positive effect of the fluctuating regime in improving the classical fitness traits (Colinet et al., 2006b; Ismail et al., 2010). Nevertheless, here the values of fecundity parameters stay below the control values. Finally the constant treatments provoke a reduced fecundity compared to control.

In conclusion, an effective storage technique should result in a high survival, low sterility and a high acceptability of the partners, and should allow a high reproductive activity as soon as possible in the adult female life (Ismail et al., 2010; Tauber et al., 1993). Measuring the classical fitness parameters is currently not enough particularly if r_m is used as it can mask immediate effects. We suggested thereby the use of the cumulative production of

female offspring, including the analyses of the curve shape as an indicator of fitness before release. For biological control, the important point is the number of parasitoid females that will be produced at G1 generation, as this first wave has a tremendous importance to stop the early growth of the pest population (Mahmoudi et al., 2010). For the moment, we also suggested that storage at 0°C for 1 week could be a suitable treatment to store the mummies of *A. ervi* without any deleterious effects on the growth rate for a short period. The effects of the low temperature of 0°C should be more investigated for long storage procedure before mass release when needed and the behaviour of the emerging individuals should be investigated as it was shown that some treatments can produce apparently healthy individuals, but with altered behaviours (van Baaren et al. 2005).

Acknowledgements

This study was supported by a scholarship from the Syrian Ministry of Higher Education, and funded by the UMR 6553 CNRS Ecobio (Université de Rennes1). We thank Viridaxis S.A. in Belgium for providing *A. ervi*. This publication is n° BRC200 of the Biodiversity Research Centre.

References

- Amir-Maafi, M., Chi, H., 2006. Demography of *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) on two *pyralid* hosts (Lepidoptera: Pyralidae). *Annals of the Entomological Society of America* 99, 84-90.
- Atlihan, R., Chi, H., 2008. Temperature-dependent development and demography of *Scymnus subvillosus* (Coleoptera: Coccinellidae) reared on *Hyalopterus pruni* (Homoptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology* 101, 325-333.
- Birch, L.C., 1948. The intrinsic rate of natural increase of an insect population. *Journal of Animal Ecology* 17, 15-26.
- Blanco, C.A., Portilla, M., Abel, C.A., Winters, H., Ford, R., Streett, D., 2009. Soybean flour and wheat germ proportions in artificial diet and their effect on the growth rates of the tobacco budworm, *Heliothis virescens*. *Journal of Insect Science* 9.
- Bressac, C., Chevrier, C., 1998. Offspring and sex ratio are independent of sperm management in *Eupelmus orientalis* females. *Journal of Insect Physiology* 44, 351-359.
- Carey, J.R., 1993. *Applied Demography for Biologist with Special Emphasis on Insects*. Oxford University Press, Oxford.
- Chen, N.L., Leopold, R.A., Boetel, M.A., 2008a. Cold Storage of Adult *Gonatocerus ashmeadi* (Hymenoptera: Mymaridae) and Effects on Maternal and Progeny Fitness. *Journal of Economic Entomology* 101, 1760-1770.
- Chen, W.L., Leopold, R.A., Harris, M.O., 2008b. Cold storage effects on maternal and progeny quality of *Gonatocerus ashmeadi* Girault (Hymenoptera: Mymaridae). *Biological Control* 46, 122-132.
- Chi, H., 1988. Life-table analysis incorporating both sexes and variable development rates among individuals. *Environmental Entomology* 17, 26-34.
- Chi, H., Su, H.Y., 2006. Age-stage, two-sex life tables of *Aphidius gifuensis* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) and its host *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) with mathematical proof of the relationship between female fecundity and the net reproductive rate. *Environmental Entomology* 35, 10-21.
- Colinet, H., Hance, T., Vernon, P., 2006a. Water relations, fat reserves, survival, and longevity of a cold-exposed parasitic wasp *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Aphidiinae). *Environmental Entomology* 35, 228-236.

- Colinet, H., Renault, D., Hance, T., Vernon, P., 2006b. The impact of fluctuating thermal regimes on the survival of a cold exposed parasitic wasp, *Aphidius colemani*. *Physiological Entomology* 31, 234-240.
- Couillien, D., Gregoire, J.C., 1994. Take-off capacity as a criterion for quality-control in mass-produced predators, *Rhizophagus grandis* (Col, Rhizophagidae) for the biocontrol of bark beetles, *Dendroctonus micans* (Col, Scolytidae). *Entomophaga* 39, 385-395.
- Dias, N.D., Parra, J.R.P., Dias, C.T.D., 2010. Fertility life table of three neotropical species of Trichogrammatidae on factitious hosts as a criterion for selection of hosts. *Revista Brasileira De Entomologia* 54, 120-124.
- Ehler, L.E., 1990. Introduction strategies in biological control of insects. In: Mackauer, M., Ehler, L.E., Roland, J., Eds.), *Critical Issues in Biological Control Intercept*. Andover, UK, pp. 11–134.
- Hance, T., Neuberg, P., Noel-Lastelle, C., 1998. The use of fecundity, lobe biometry and the RAPD-PCR technique in order to compare strains of *Tetranychus* sp. *Experimental & Applied Acarology* 22, 649-666.
- Hance, T., Nibelle, D., Lebrun, P., van Impe, G., van hove, C., 1994. Selection of *Azolla* forms resistant to the water lily aphid, *Rhopalosiphum nymphaeae* - Susceptibility of *Azolla* forms to *Rhopalosiphum nymphaeae*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 70, 19-25.
- Hoffmann, A.A., Parsons, P.A., 1989. Selection for increased desiccation resistance in *drosophila melanogaster*: additive genetic control and correlated responses for other stresses. *Genetics* 122, 837-845.
- Ismail, M., van Baaren, J., Hance, T., Pierre, J.S., Vernon, P., Submitted. Stress intensity and fitness: low temperature combined with fluctuating regime is a must. In preparation
- Ismail, M., Vernon, P., Hance, T., van Baaren, J., 2010. Physiological costs of cold exposure on the parasitoid *Aphidius ervi*, without selection pressure and under constant or fluctuating temperatures. *BioControl* 55, 729–740.
- Kennedy, J.S., Hance, T., 1995. Varietal screening based on demographic parameters: Resistance of tea to *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). *Environmental Entomology* 24, 1481-1486.
- Kennedy, J.S., van Impe, G., Hance, T., Lebrun, P., 1996. Demecology of the false spider mite, *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari, Tenuipalpidae). *Journal of Applied Entomology-Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie* 120, 493-499.

- Leopold, R.A., 1998. Cold storage of insects for integrated pest management. In: Hallman, G.J., Denlinger, D.L., Eds.), Temperature sensitivity in insects and application in integrated pest management. West view Press, Boulder, pp. 235–267.
- Leopold, R.A., Rojas, R.R., Atkinson, P.W., 1998. Post pupariation cold storage of three species of flies: Increasing chilling tolerance by acclimation and recurrent recovery periods. *Cryobiology* 36, 213-224.
- Levie, A., Vernon, P., Hance, T., 2005. Consequences of acclimation on survival and reproductive capacities of cold-stored mummies of *Aphidius rhopalosiphii* (Hymenoptera: Aphidiinae). *Journal of Economic Entomology* 98, 704-708.
- Lopez, S.N., Botto, E., 2005. Effect of cold storage on some biological parameters of *Eretmocerus corni* and *Encarsia formosa* (Hymenoptera : Aphelinidae). *Biological Control* 33, 123-130.
- Luczynski, A., Nyrop, J.P., Shi, A., 2007. Influence of cold storage on pupal development and mortality during storage and on post-storage performance of *Encarsia formosa* and *Eretmocerus eremicus* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Biological Control* 40, 107-117.
- Mahmoudi, M., Sahragard, A., Sendi, J.J., 2010. Effects of age and host availability on reproduction of *Trioxys angelicae* Haliday (Hymenoptera: Braconidae) parasitizing *Aphis fabae* Scopoli (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Pest Science* 83, 33-39.
- Marsh, P.M., 1977. Notes on taxonomy and nomenclature of *Aphidius* species (Hymenoptera Aphidiidae) parasitic on pea aphid in North-America. *Entomophaga* 22, 365-372.
- Meyer, J.S., Ingersoll, C.G., McDonald, L.L., Boyce, M.S., 1986. Estimating uncertainty in population - growth rates - jackknife vs bootstrap techniques. *Ecology* 67, 1156-1166.
- Omer, A.D., Johnson, M.W., Tabashnik, B.E., 1996. Demography of the leafminer parasitoid *Ganaspidium utilis* Beardsley (Hymenoptera: Eucolidae) at different temperatures. *Biological Control* 6, 29-34.
- Pitcher, S.A., Hoffmann, M.P., Gardner, J., Wright, M.G., Kuhar, T.P., 2002. Cold storage of *Trichogramma ostrinae* reared on *Sitotroga cerealella* eggs. *Biocontrol* 47, 525-535.
- R Development Core Team., 2008. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0 [WWW document]. URL <http://www.R-project.org>
- Raltson, M.L., Jennrich, R.I., 1978. D.U.D., a derivative free algorithm for non linear least squares. *Technometrics* 20, 7–14.
- Rundle, B.J., Thomson, L.J., Hoffmann, A.A., 2004. Effects of cold storage on field and laboratory performance of *Trichogramma carverae* (Hymenoptera :

- Trichogrammatidae) and the response of three *Trichogramma* spp. (*T. carverae*, *T. nr. brassicae*, and *T. funiculatum*) to cold. *Journal of Economic Entomology* 97, 213-221.
- Sigsgaard, L., 2000. The temperature-dependent duration of development and parasitism of three cereal aphid parasitoids, *Aphidius ervi*, *A. rhopalosiphi*, and *Praon volucre*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 95, 173-184.
- Starý, P., 1978. Seasonal relations between lucerne, red-clover, wheat and barley agro-ecosystems through aphids and parasitoids (Homoptera: Aphididae; Hymenoptera: aphidiidae). *Acta Entomologica Bohemoslovaca* 75, 296-311.
- Stilmant, D., van Bellinghen, C., Hance, T., Boivin, G., 2008. Host specialization in habitat specialists and generalists. *Oecologia* 156, 905-912.
- Tauber, M.J., Tauber, C.A., Gardescu, S., 1993. Prolonged storage of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environmental Entomology* 22, 843-848.
- van Impe, G., Hance, T., 1993. Une technique d'évaluation de la sensibilité variétale au tétranyque tisserand, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Application au haricot, au concombre, à la tomate et au fraisier. Agronomie* 13, 739- 749.
- Waage, J.K., 1986. Family planning in parasitoids: adaptive patterns of progeny and sex allocation. In: Waage, J.K., Greathead, D.J., Eds.), *Insect parasitoids*. Academic Press, , pp. 63–95.
- Yang, T.C., Chi, H., 2006. Life tables and development of *Bemisia argentifolii* (Homoptera : Aleyrodidae) at different temperatures. *Journal of Economic Entomology* 99, 691-698.

Table 1. Changes in demographic growth parameters in adults emerged after mummy storage, according to the storage temperature, duration and thermal regime. Data are presented as mean \pm SE, obtained by the Jackknife method. T_c : development time (storage period was not Taken into account), R_0 : the net reproductive rate, r_m : The intrinsic rate of increase, and λ : the finite rate of increase.

Temperature	Thermal regime	Storage duration (wk)	The demographic rate parameters						
			Survival	Tc	R0	rm	λ	Net fecundity	Net fertility
20°C	T	0 (N = 15 females)	0.97 ± 1.71	17.85 ± 0.02	41.61 ± 0.39	0.212 ± 0.007	1.238 ± 0.009	80.21 ± 0.56	74.54 ± 0.51
	C	1 (N = 13 females)	0.95 ± 2.18	15.53 ± 0.01	26.23 ± 0.20	0.213 ± 0.007	1.238 ± 0.007	62.55 ± 0.47	57.61 ± 0.44
		2 (N = 13 females)	0.94 ± 2.37	14.20 ± 0.01	24.21 ± 0.30	0.226 ± 0.011	1.255 ± 0.013	60.11 ± 0.30	57.11 ± 0.28
	F	1 (N = 15 females)	0.97 ± 1.71	15.30 ± 0.02	36.15 ± 0.31	0.238 ± 0.006	1.269 ± 0.007	70.87 ± 0.53	76.13 ± 0.51
2 (N = 13 females)		0.96 ± 1.96	13.82 ± 0.02	30.15 ± 0.25	0.252 ± 0.007	1.287 ± 0.009	63.85 ± 0.50	59.85 ± 0.47	
4°C	C	1 (N = 13 females)	0.92 ± 2.71	16.50 ± 0.01	20.46 ± 0.24	0.185 ± 0.008	1.204 ± 0.010	62.38 ± 0.59	53.85 ± 0.59
		2 (N = 13 females)	0.89 ± 3.13	15.49 ± 0.04	21.77 ± 0.36	0.206 ± 0.013	1.230 ± 0.016	59.69 ± 0.56	51.23 ± 0.51
	F	1 (N = 13 females)	0.98 ± 1.40	16.27 ± 0.03	38.77 ± 0.53	0.230 ± 0.010	1.259 ± 0.012	82.23 ± 0.53	73.15 ± 0.48
		2 (N = 13 females)	0.96 ± 1.96	13.68 ± 0.02	30.62 ± 0.49	0.243 ± 0.014	1.277 ± 0.018	66.92 ± 0.59	61.08 ± 0.57
0°C	C	1 (N = 6 females)	0.95 ± 2.18	16.74 ± 0.03	45.3 ± 1.53	0.232 ± 0.011	1.256 ± 0.003	89.88 ± 2.55	79.43 ± 2.56
		2 (N = 7 females)	0.80 ± 4.00	16.95 ± 0.03	31.57 ± 1.71	0.208 ± 0.014	1.225 ± 0.004	63.14 ± 1.55	58.20 ± 1.62
	F	1 (N = 6 females)	0.95 ± 2.18	15.66 ± 0.03	32.83 ± 1.57	0.227 ± 0.017	1.249 ± 0.004	73.83 ± 1.67	64.67 ± 1.30
		2 (N = 6 females)	0.94 ± 2.37	15.02 ± 0.03	33.33 ± 1.95	0.239 ± 0.019	1.262 ± 0.005	75.53 ± 2.53	61.47 ± 2.63

Table 2. Results of variance analyses between treatments. Different letters indicated significant differences among the factors ($\alpha = 0.05$).

	The demographic rate parameters				Net fecundity	Net fertility
	Tc	R ₀	r _m	λ		
Storage temperature						
20°C	A	a	a	a	a	a
7°C	C	b	a	a	b	c
4°C	B	b	a	a	b	c
0°C	Ab	a	a	a	a	b
Storage duration (wk)						
0	A	a	a	a	a	a
1	B	b	a	a	b	b
2	C	c	a	a	c	c
Thermal regime						
20°C	A	a	ab	ab	a	a
F	B	b	a	a	b	b
C	C	c	b	b	c	c

Table 3. Maximum of G1 offspring of *A. erwi* when cumulative fecundity is fitted to logistical equation. Non-overlapping confidence interval are considered to differ significantly among the treatments (= 0.05). - and + indicate respectively the lower and upper limits of the 95% confidence intervals.

Temperature	Thermal regime	Storage duration	The cumulative fecundity								
			K value	-	+	Inflection point (a)	-	+	Slope (b)	-	+
20°C	T	0	44.38 ± 0,17 ab	44.04	44.72	2.33 ± 0,03 b	2.28	2.38	1.07 ± 0.03 b	1.02	1.12
7°C	C	1	26.84 ± 0,13 e	26.58	27.09	1.87 ± 0.0 2 c	1.82	1.90	0.86 ± 0.02 c	0.81	0.91
		2	25.57 ± 0,55 e	24.47	26.66	1.69 ± 0.12 c	1.45	1.92	1.30 ± 0.14 a	1.20	1.58
	F	1	37.58 ± 0,21 c	37.17	37.98	1.74 ± 0.03 c	1.68	1.80	1.06 ± 0.03 b	0.99	1.13
		2	31.17 ± 0,22 d	30.73	31.6	2.25 ± 0.03b	2.18	2.32	1.15 ± 0.03ab	1.08	1.22
4°C	C	1	21.97 ± 0,15 g	21.68	22.26	2.03 ± 0.03 b	1.97	2.09	0.84 ± 0.03 c	0.78	0.90
		2	24.46 ± 0,17 f	24.12	24.79	1.79 ± 0.04c	1.71	1.88	1.11 ± 0.05 ab	1.02	1.21
	F	1	39.79 ± 0,30 b	39.20	40.38	2.72 ± 0.3 a	2.65	2.79	1.06 ± 0.03 b	0.99	1.12
		2	31.74 ± 0,29 d	31.15	32.32	1.67 ± 0.05 c	1.58	1.76	0.99 ± 0.05 bc	0.89	1.10
0°C	C	1	45.82 ± 0,68 a	44.46	47.19	2.20 ± 0.08 b	2.04	2.35	0.91 ± 0.07 bc	0.77	1.07
		2	27.44 ± 0,68 e	26.07	28.81	2.56 ± 0.12ab	2.32	2.81	0.85 ± 0.11 bc	0.64	1.08
	F	1	33.02 ± 0,78 d	31.45	34.59	2.12 ± 0.10 b	1.93	2.32	0.74 ± 0.09 c	0.56	0.92
		2	33.53 ± 0,79 d	31.93	35.13	2.50 ± 0.11 ab	2.28	2.72	0.76 ± 0.11 c	0.56	0.96

Figure legends

Figure 1. Cumulative fecundity of females at different storage temperatures (7, 4, and 0°C) comparing to control females at 20°C, according to their age. Each temperature had 4 treatments (CnTrl: 20°C, C1: constant storage for 1 wk, C2: constant storage for 2 wks, F1: fluctuating storage for 1 wk, and F2: fluctuating storage for 2 wks).

Figure 2. Effect of female age on the progeny sex ratio (measured as proportion of females), after mummies storage at different temperatures (7, 4, and 0°C). Each temperature had 4 treatments (CnTrl: 20°C, C1: constant storage for 1 wk, C2: constant storage for 2 wks, F1: fluctuating storage for 1 wk, and F2: fluctuating storage for 2 wks).

Figure 1.

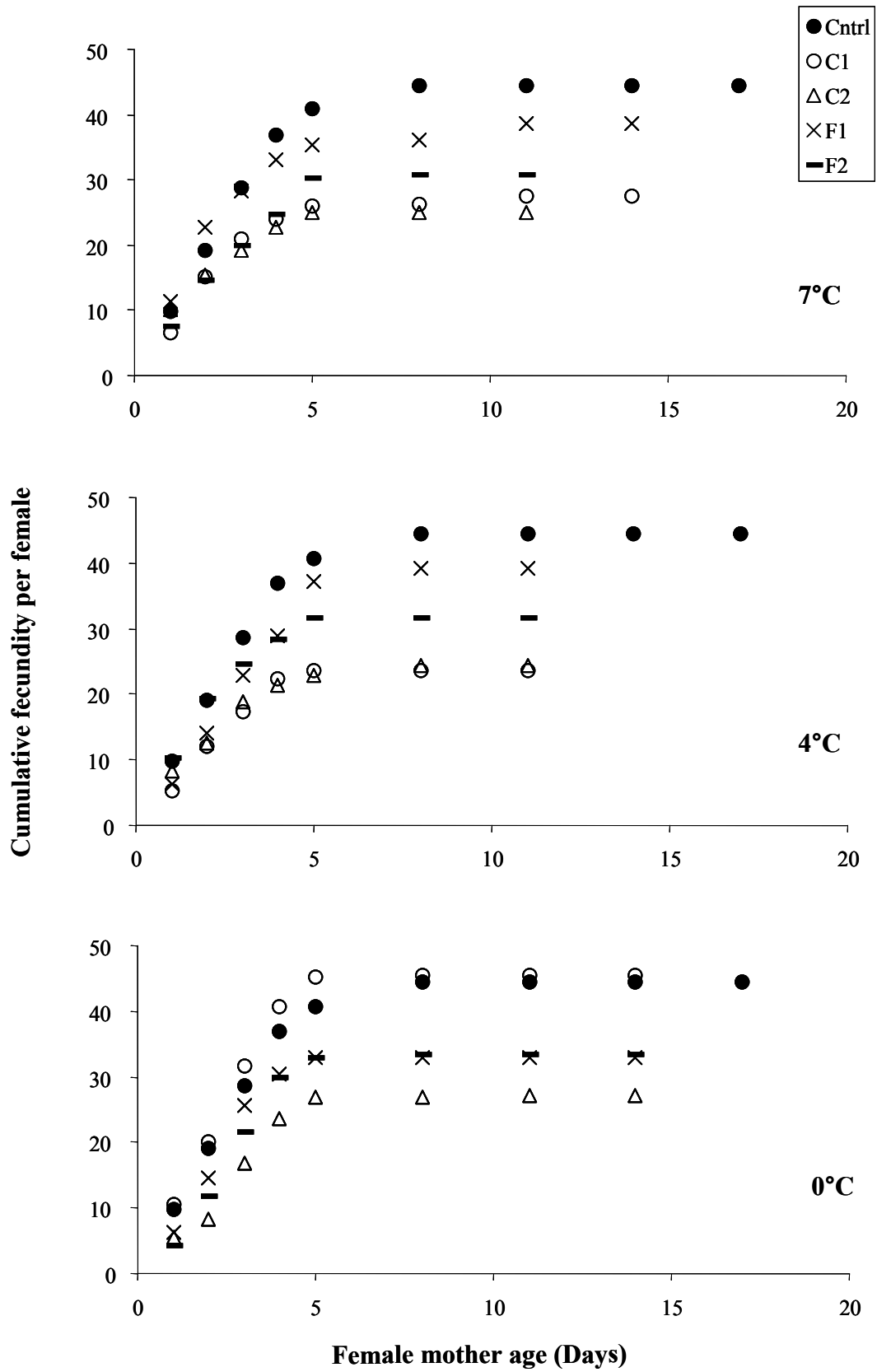
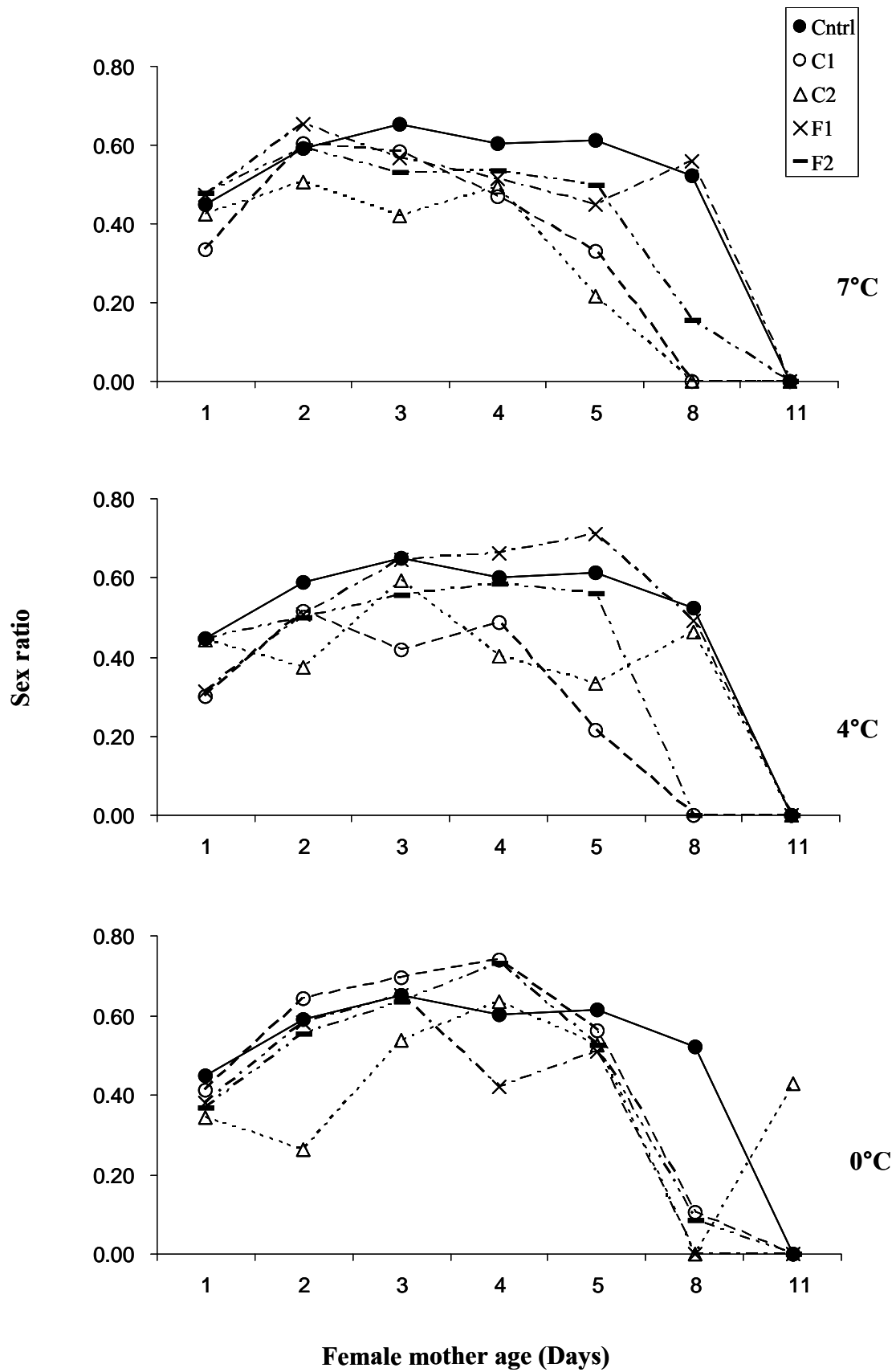


Figure 2.



Chapitre 6

Stress intensity and fitness: low temperature combined with fluctuating regime is a must

Mohannad Ismail, Joan van Baaren, Thierry Hance, Jean-Sébastien Pierre, and Philippe Vernon

Submitted in Naturwissenschaften

Stress intensity and fitness: low temperature combined with fluctuating regime is a must

Mohannad Ismail^{1,3}, Joan van Baaren¹, Thierry Hance³, Jean-Sébastien Pierre¹, and Philippe Vernon²

1 UMR 6553 CNRS—EcoBio, Université de Rennes 1, France

2 UMR 6553 CNRS, EcoBio, Université de Rennes 1, Station Biologique de Paimpont, Paimpont, France

3 Unité d'Ecologie et de Biogéographie, Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgique

UMR 6553 CNRS—EcoBio, Université de Rennes 1,

263 Avenue du Général Leclerc, CS74205,

35042 Rennes

France

e-mail: mohannad.ismail@univ-rennes1.fr

Résumé

Lorsqu'on expose des individus à différents traitements d'intensité de stress croissante, on s'attend à ce que les traits de fitness soient de plus en plus affectés.. Cependant, dans certains cas, des individus extrêmement résistants ont été observés, lors de stress induisant un taux de mortalité très important.

Nous avons exposé des momies âgées de un jour pendant quatre semaines à deux basses températures (4 et 0°C) et à deux régimes thermiques (constant et fluctuant). Nos résultats ont montré que les individus résistants ne sont obtenus qu'après un fort taux de mortalité, comme prédit. Ces individus sont aussi performants que les individus témoins pour les traits mesurés (charge en œufs à l'émergence et longévité), mais leur taille est réduite. Cela implique que les petits individus de ce traitement sont plus résistants que les grands.

Les deux traitements fluctuants à 4 et 0°C ont induit un taux émergence élevé, mais au détriment des réserves lipidiques. De manière inattendue, le traitement fluctuant associé à la température de 0°C présentait à la fois une faible mortalité et une production d'individus performants, contrairement au traitement potentiellement moins stressant (régime fluctuant associé à une température de 4°C). Ce résultat ouvre une nouvelle voie de recherches en écologie du stress et pourrait modifier la pratique du stockage de froid en lutte biologique.

Mots-clés: *Aphidius ervi*, fitness, teneur en lipides, intensité du stress, températures

Abstract

Stresses of increasing intensity are expected to affect the fitness traits of an organism more and more negatively, but in particular cases, extremely resistant individuals were observed. The present study was undertaken to determine the effects of different stress intensities on parasitoid wasp fitness traits. We exposed 1-day-old nymphs for four weeks to combinations of two low temperatures (4 and 0°C, 0°C being the most stressful) and two thermal regimes (constant and fluctuating, constant being the most stressful), then to 4 different treatments representing 4 stresses of different intensity levels. Our results showed that resistant individuals occurred only in the most stressful treatment (0°C, constant), which induced a higher mortality rate. These resistant individuals performed as well as those of the control, despite a reduction in their size. The fluctuating regimes, at both temperatures, presented a high emergence rate, but at the expense of higher lipid consumption. Unexpectedly, the fluctuating treatment associated with the presumably more stressful temperature (0°C) produced individuals without a decrease in the measured fitness traits, contrary to the less stressful treatment (4°C, fluctuating temperature). This result opens a new area of research in stress ecology and could modify the practice of cold storage in biological control.

Keywords: *Aphidius ervi*, fitness, lipid content, stress intensity, fluctuating temperature

Introduction

Stress is defined as “any environmental change that drastically reduces the fitness of an organism” (Hoffmann and Parsons 1997). Moreover, it is known that many fitness traits correlated negatively with stress intensity. However, it was sometimes found that in extreme conditions (cold, heat, starvation, insecticides), a very small proportion of survivors of the exposed cohort (called extreme individuals) are able to perform as well as or better than individuals not exposed to the stressful conditions (Danks 1983). This capacity of the extreme individuals could be related to the genetic diversity that exists among the individuals in the natural populations. Genetic variation could play an important role in adaptability of a population when strong changes occur, resulting from different proportions of the phenotypes (Wajnberg 2004).

Temperature is an abiotic factor which plays an important role in determining the distribution and abundance of populations. Moreover, it affects behaviour, physiology, and life history in animals (Blanckenhorn and Henseler 2005; Bublily and Loeschke 2005; Angilletta 2009b), and it has been extensively used as a factor of stress (Hoffmann et al. 2003). The ability of an organism to survive and to reproduce often depends on how the organism will deal with thermal extremes (Cooper et al. 2008; Angilletta 2009a).

As evolutionary biologists are interested in the fitness consequences of stressful conditions (Cooper et al. 2010), physiological ecologists are involved in the mechanisms of stress resistance (Hoffmann and Parsons 1989; Djawdan et al. 1997). By combining these two approaches, in a study dealing with parasitoid insects, Amice *et al.* (2008) emphasized the necessity in the case of thermal stress, to distinguish the process which leads to simple physiological costs without mortality or that which leads to the expression of the resistant phenotypes. Concerning the second process, when a cohort of individuals is submitted to increasing intensity of stress, the mortality rate increased accordingly. Consequently, the survivors could be either low-performance, as they are heavily affected by stress, or in some cases when a very high mortality rate occurred, they could display an outstanding level of stress resistance and may be considered as extreme individuals in the population, as defined by Danks (1983). Then, measuring the fitness of surviving individuals represents a bias, as individuals that die are the most affected by stresses because of their lack of phenotypic plasticity or of their genetic background. Consequently, the means of several measured traits on surviving individuals could be skewed (Amice et al. 2008). It is only in sub-lethal treatments, where no mortality occurred, that physiological costs could be evaluated on

different fitness traits, like longevity or fecundity. We expect that these fitness traits will be affected in proportion of stress intensity or duration.

In this paper, we aim to assess which level of stress intensity is relevant for the production of resistant phenotypes in parasitoids susceptible to lead to the advent of extreme individuals. In that context, cold thermal stresses might be convenient as the intensity of stress may be modulated to create a gradient by using different temperatures and constant or fluctuating regimes (i.e. a cold period interrupted by a return to a higher temperature for a short time) (Bale 1991). Numerous empirical studies on the effects of cold stresses were realized on parasitoids in the context of their cold storage before inundative releases in biological control programmes. These empirical studies emphasized that cold storage represents a stress which can affect different parameters of fitness. In the majority of the studies, longevity and fecundity were the most frequently studied fitness traits, since a trade-off is found between these two traits (Ellers 1996). It was shown that decreasing temperatures affect survival and different fitness traits of surviving adults (Pandey and Johnson 2005), and that fluctuating temperatures reduced these problems (Colinet et al. 2006; Ismail et al. 2010). We applied an experimental design with four combinations of stresses (i.e. two temperatures, each in constant and fluctuating regimes) with a gradient of stress intensity. We predicted that (i) we would obtain high-level performance individuals only in treatments inducing a high rate of mortality. (ii) the sub-lethal treatments would induce physiological costs, like a decrease in longevity and/or fecundity. (iii) the most stressful treatment would be the combination with the lower temperature and constant regime, and the less stressful would be the treatment with the higher temperature combined with the fluctuating regime.

Materials and methods

We chose the parasitoid *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae) as a model. It is commercially produced and widely distributed in several European countries for mass release. It is a common cosmopolitan solitary endo-parasitoid of several aphid species of economically important crops such as legumes and cereals (Stilmant et al. 2008). A large batch (more than 300 mummies) of *A. ervi* reared on the grain aphid *Sitobion avenae* F (Homoptera: Aphididae) was provided in January 2007 and another one in January 2008 by Viridaxis S.A. in Belgium. This company regularly renewed their rearing. In our laboratory, it was reared on a SA1 clone (INRA collection) of the same host species, which was collected from the wheat crops around Rennes, France in 1990. The aphids were reared in laboratory conditions in small pots of wheat (*Triticum aestivum* L, cv. Boston). Parasitoids and hosts

were maintained in Plexiglas cages (50 × 50 × 50 cm) in climate rooms at 20 ± 1°C, 60 ± 10% RH with a photoperiod 16L: 8D. *Aphidius ervi* was reared for three generations before the experiments.

One-day-old mummies (dead aphids containing the parasitoid nymph) were used as the most suitable instar for storage in aphid parasitoids (Levie *al.* 2005). We used two storage temperatures, 4 and 0°C and for each storage temperature, two thermal regimes: a constant one, and a fluctuating one (each day: 22 hours at the storage temperature and 2 hours at 20°C as described by Colinet *et al.* (2006). We stored them for 4 weeks, i.e. a stressful duration of cold exposure, as it has been shown that costs of storage begin to appear after 2 weeks in this species (Ismail *et al.* 2010). Finally, we had five treatments, the control and the four combinations (4°C constant regime: 4C; 4°C fluctuating regime: 4F; 0°C constant regime: 0C and 0°C fluctuating regime: 0F). Treated mummies were acclimated by exposing them progressively from 20°C to 4°C (with 2h at 16, 12 and 8°C), and to 0°C (with 2h at 15, 10 and 5°C). During the storage, they were kept in a thermo-regulated Sanyo incubator with a precision of ± 1°C, under a photoperiod 16L: 8D. After cold storage, mummies were progressively transferred to 20°C, with 2 hours at 8, 12, and 16°C for mummies stored at 4°C, and with 2 hours at 5, 10, and 15°C for mummies stored at 0°C. For the five treatments, we measured the following parameters:

Emergence rate

The emergence rate was measured by placing 100 mummies per treatment individually in a small gelatin capsule (Ø = 0.5 cm, L = 1.5 cm). Adult emergence rate was expressed as the number of individuals which emerged from these mummies.

Longevity

Males and females were put individually in small tubes (1.5 cm diameter and 10 cm long), and they were provided with water and honey during their life. The lifespan in days was measured by observing them daily at the same time until death.

Size

To study the effect of storage at low temperature on adults' size, we measured the length of the hind tibia of each individual (male and female) for each temperature and each thermal regime with the numeric image analysis software Pegasus Pro V4 under a binocular microscope (× 3.15, Olympus SZCTV) linked to a video camera (JVC KY-F50). Hind tibia

length was measured from the femur: tibia joint to the tibia: tarsus joint. Tibia length is the most common indicator of body size in parasitoid wasps (Godfray 1994).

Egg load at emergence

Females less than 2 h old were dissected in a drop of water on a microscope slide under a microscope (x4, Olympus BH2) to count the number of mature eggs in the ovaria at emergence. Mature eggs were distinguished from non-mature eggs because they were completely formed (Le Ralec 1991). In these species, we have shown that egg load is linked to the realized fecundity in the control conditions, and after 1 and 2 weeks of cold storage at 7°C, in constant and fluctuating thermal regimes (Ismail al. 2010).

Fat content

For each treatment, 20 mummies were used for individual mass measurement (micro-electrobalance sensitivity 0.001 mg, Sartorius, Germany). Dry mass (DM) was obtained after exposing the mummies to 60°C for 3 days in an air oven. To evaluate the lipid level after the storage, each dried mummy was placed for 2 weeks in an Eppendorf tube containing 1ml of the extracting solution methanol/chloroform (1:2) (Vernon and Vannier 1996). Then the mummies were dried for 12 h in an air oven at 60°C to remove the extracting solution to measure the lean dry mass (LDM). Body fat mass (FM) was obtained by subtracting LDM from DM, and fat content (FC) was calculated as a proportion (FC=FM/LDM).

Statistical analyses

Emergence rates were compared among treatments using an χ^2 test. Since the objective of this study is to study the gradient of the intensity of stress, we compared the longevity among treatments (as a factor) for males and females separately by using the Cox Proportional Hazard Model, followed by Tukey's HSD test ($\alpha = 0.05$) for pairwise comparisons when significant differences were found. Hind tibia length, egg load at emergence, and lipid content were compared by using analysis of variance (Anova) with treatment as a factor, followed by Tukey's HSD test ($\alpha = 0.05$) for pairwise comparisons when significant difference was found. Data are presented as (mean or percentage) \pm SE. Statistical analyses were done using the statistical package software R version 2.8.0 (R Development Core Team 2008).

Results

The emergence rate decreased significantly compared to the control only in the constant treatments ($\chi^2_2 = 84.73$; $p < 0.001$) and was the lowest for the 0C treatment. Both fluctuating treatments showed an emergence rate similar to the control ($\chi^2_2 = 0.35$; $p = 0.84$) (Fig. 1).

Longevity for both sexes reduced significantly in the two treatments at 4°C compared to the control (Females: $\chi^2_4 = 43.1$; $p < 0.001$), (Males: $\chi^2_4 = 16.1$; $p = 0.002$) (Table 1).

The size of the individuals decreased significantly in the treatment 0C for both sexes compared to control and other treatments (Female: $F_{4,123} = 9.62$; $p < 0.001$), (Male: $F_{4,128} = 10.19$; $p < 0.001$) (Table 2).

Egg load at emergence (20°C = 78.53 ± 2.35 ; 4C = 72.10 ± 2.31 ; 4F = 69.42 ± 2.76 ; 0C = 68.70 ± 3.33 ; and 0F = 89.92 ± 2.94) did not decrease significantly among the storage treatments ($F_{4,211} = 1.13$; $p = 0.35$).

Mummy lipid content decreased significantly in all treatments compared to the control ($F_{4,125} = 24.49$; $p < 0.001$) (Fig. 2).

Discussion

Selection and physiological costs

Table (3) summarizes all the negative effects of the different treatments compared to the control. Although the emergence rate was reduced in the two constant treatments, it is only the 0C treatment which could induce the emergence of extremely resistant phenotypes as defined by Danks (1983). As predicted, these individuals performed as well as the control.

They were, however, smaller. The smaller surviving individuals are possibly the best adapted to cold stress. In parasitoids, most of the studies point to the fact that large individuals have a better fitness (Godfray 1994; Visser 1994; Rivero and West 2002). Indeed, large individuals are expected to live longer, to have higher fecundity, higher mating success, and better dispersal ability than small ones (Ellers et al. 1998; Sagarra et al. 2001; Doyon and Boivin 2005). However, in our previous study of *Aphidius ervi*, we found that small individuals were less affected than large ones by a treatment of cold storage at higher temperatures (4 and 7°C) (Ismail et al. submitted). Here, our results confirmed our previous study and the hypothesis of “absolute energy demand” which predicted that large individuals, in constrained conditions, need to use more energy to sustain their body functions, so will suffer more during a stress (Blanckenhorn et al. 1995; Blanckenhorn 2005; Reim et al. 2006;

Ismail et al. Submitted). It is known that large individuals have larger organs, which are energetically expensive to build and maintain (Suarez 1998).

Confirming our second prediction, the treatments 4F and 4C, induced physiological costs. The treatment 4F showed a high survival rate (90 %), but the survivors suffered from a reduction in their longevity. The treatment 4C presented a moderate survival rate (57 %), and the emerged individuals also presented a reduction in their longevity. In these treatments, there was not enough mortality to obtain only the extreme individuals as mentioned by Danks (1983). The differences between these two treatments are that in 4F, individuals represented all the stressed ones, whereas in 4C, the surviving ones represented only those which successfully resisted this stress. In both cases, the observed physiological costs were expressed by affecting only adult longevity, confirming the results of Ismail et al. (2010) which showed that longevity was the first trait affected in the case of cold stress.

Fluctuating regimes at low temperatures are a must

Finally, we showed that the constant treatments are more stressful than the fluctuating ones, as the emergence rate decreased only in the constant treatments. The repairing action of the physiological damages suggested by Leopold *et al.* (1998) and Colinet et al. (2006) in fluctuating treatments could probably explain these results. Colinet et al. (2007) found that fluctuating treatments are associated with up-regulation of several mechanisms: glycolysis, TCA cycle, synthesis and conversion of ATP, and heat shock proteins (Hsp70/Hsp90), compared to the constant ones. Kostal et al. (2007) also found that the concentration of the potassium ions in fluctuating treatments is significantly lower than in the constant ones.

On the other hand, individuals in the fluctuating treatments are exposed to cold stress for a smaller amount of time than in the constant treatments, so the accumulation of the toxic products could also be slower in the fluctuating treatments than in the constant ones (Renault, Nedved et al. 2004). We also observed that the high emergence rate in fluctuating regimes was accompanied by the highest consumption of lipid reserves, enlightening the possible costs of such repairs.

As predicted, 0C treatment was the most stressful treatment inducing the lowest emergence rate, but the survivors performed well. However, contrary to our predictions, the 4F treatment was not the least stressful one, since longevity was reduced, whereas it was not the case in the 0F treatment. Surprisingly the 0F treatment represented the best one, since it showed a high emergence rate and performances equal to those of the control individuals. An explanation for these results in 0F treatment could be a reduction in metabolic rate at 0°C,

allowing the nymphs to better resist stress. Indeed, it was found that a reduction in metabolic rate might serve as a mechanism to resist a stress (Hoffmann and Parsons 1989).

For example, it has been demonstrated that a low metabolic rate could explain both better fecundity and better longevity in a *Drosophila* parasitoid population compared to another one (Martel et al. submitted). However, as the consumption of lipids was high during this storage treatment, the costs should thereby appear in a fitness trait that we did not take into consideration in this study like lifetime fecundity or mobility. For example, we have shown in this species that the egg load at emergence was correlated to the lifetime fecundity after 1 or 2 weeks of cold storage at 7°C (Ismail et al. 2010). It is possible that this correlation did not exist for 4 weeks of storage at 0°C, and that the lifetime fecundity could be reduced.

In conclusion, we suggest that the combination of a storage temperature of 0°C and a potentially repairing fluctuating regime allows an unexpected conservation of emergence rate and fitness traits. The reparation effects were more important at 0°C than 4°C, though the mechanism remains to be fully understood. For the moment, no application of 0°C in cold storage is done, since only the negative effects of using this temperature in combination with constant thermal regime are known. However, it could importantly modify current applications in biological control (e.g. cold storage of natural enemies), by using this low temperature associated with the fluctuating regime.

Acknowledgements

This study was supported by a scholarship from the Syrian Ministry of Higher Education, and funded by the UMR 6553 CNRS Ecobio (University of Rennes1). We thank Viridaxis S.A. in Belgium for providing *A. ervi*.

References

- Amice G, Vernon P, et al. (2008). Variability in responses to thermal stress in parasitoids. *Ecological Entomology* 33(6): 701-708. doi 10.1111/j.1365-2311.2008.01019.x
- Angilletta MJ (2009a). Looking for answers to questions about heat stress: researchers are getting warmer. *Functional Ecology* 23(2): 231-232. doi 10.1111/j.1365-2435.2009.01548.x
- Angilletta MJ (2009b) *Thermal Adaptation: A Theoretical and Empirical Synthesis*. Oxford University Press, Oxford.
- Bale JS (1991). Insects at low-temperature - a predictable relationship. *Functional Ecology* 5(2): 291-298
- Blanckenhorn WU (2005). Behavioral causes and consequences of sexual size dimorphism. *Ethology* 111(11): 977-1016
- Blanckenhorn WU and Henseler C (2005). Temperature-dependent ovariole and testis maturation in the yellow dung fly. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 116(3): 159-165
- Blanckenhorn WU, Preziosi RF, et al. (1995). Time and energy constraints and the evolution of sexual size dimorphism - to eat or to mate. *Evolutionary Ecology* 9(4): 369-381
- Bubliy OA and Loeschcke V (2005). Correlated responses to selection for stress resistance and longevity in a laboratory population of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology* 18(4): 789-803. doi 10.1111/j.1420-9101.2005.00928.x
- Colinet H, Renault D, et al. (2006). The impact of fluctuating thermal regimes on the survival of a cold exposed parasitic wasp, *Aphidius colemani*. *Physiological Entomology* 31(3): 234-240. doi 10.1111/j.1365-3032.2006.00511.x
- Cooper BS, Czarnoleski M, et al. (2010). Acclimation of thermal physiology in natural populations of *Drosophila melanogaster*: a test of an optimality model. *Journal of Evolutionary Biology* 23(11): 2346-2355. doi 10.1111/j.1420-9101.2010.02095.x
- Cooper BS, Williams BH, et al. (2008). Unifying indices of heat tolerance in ectotherms. *Journal of Thermal Biology* 33(6): 320-323. doi 10.1016/j.jtherbio.2008.04.001
- Danks HV (1983). Extreme individuals in natural populations. *Bulletin of the Entomological Society of America* 29: 41 – 46.
- Djawdan M, Rose MR, et al. (1997). Does selection for stress resistance lower metabolic rate? *Ecology* 78(3): 828-837
- Doyon J and Boivin G (2005). The effect of development time on the fitness of female *Trichogramma evanescens*. *Journal of Insect Science* 5

- Ellers J (1996). Fat and eggs: An alternative method to measure the trade-off between survival and reproduction in insect parasitoids. *Netherlands Journal of Zoology* 46(3-4): 227-235
- Ellers J, van Alphen JJM, et al. (1998). A field study of size-fitness relationships in the parasitoid *Asobara tabida*. *Journal of Animal Ecology* 67(2): 318-324
- Godfray HCJ (1994) Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology. Princeton University Press, Princeton.
- Hoffmann AA and Parsons PA (1989). Selection for increased desiccation resistance in *Drosophila melanogaster*: additive genetic control and correlated responses for other stresses. *Genetics* 122(4): 837-845
- Hoffmann AA and Parsons PA (1997) Extreme Environmental Change and Evolution. Cambridge University Press, Cambridge, MA.
- Hoffmann AA, Sorensen JG, et al. (2003). Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. *Journal of Thermal Biology* 28(3): 175-216. doi 10.1016/s0306-4565(02)00057-8
- Ismail M, Vernon P, et al. (2010). Physiological costs of cold exposure on the parasitoid *Aphidius ervi*, without selection pressure and under constant or fluctuating temperatures. *BioControl* 55: 729–740
- Kostal V, Renault D, et al. (2007). Insect cold tolerance and repair of chill injury at fluctuating thermal regimes: Role of ion homeostasis. *Comparative Biochemistry and Physiology a Molecular & Integrative Physiology* 147(1): 231-238. doi 10.1016/j.cbpa.2006.12.033
- Le Ralec A (1991) Les hyménoptères parasitoïdes : Adaptations de l'appareil reproducteur femelle. Morphologie et ultrastructure de l'ovaire, de l'œuf et de l'ovipositeur. Thèse de Doctorat, Université de Rennes 1
- Levie A, Vernon P, et al. (2005). Consequences of acclimation on survival and reproductive capacities of cold-stored mummies of *Aphidius rhopalosiphii* (Hymenoptera: Aphidiinae). *Journal of Economic Entomology* 98(3): 704-708
- Pandey RR and Johnson MW (2005). Effects of cool storage on *Anagyrus ananatis* Gahan (Hymenoptera : Encyrtidae). *Biological Control* 35(1): 9-16. doi 10.1016/j.biocontrol.2005.06.003
- Reim C, Teuschl Y, et al. (2006). Size-dependent effects of larval and adult food availability on reproductive energy allocation in the Yellow Dung Fly. *Functional Ecology* 20(6): 1012-1021. doi 10.1111/j.1365-2435.2006.01173.x

- Renault D, Nedved O, et al. (2004). The importance of fluctuating thermal regimes for repairing chill injuries in the tropical beetle *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) during exposure to low temperature. *Physiological Entomology* 29(2): 139-145
- Rivero A and West SA (2002). The physiological costs of being small in a parasitic wasp. *Evolutionary Ecology Research* 4(3): 407-420
- Sagarra LA, Vincent C, et al. (2001). Body size as an indicator of parasitoid quality in male and female *Anagyrus kamali* (Hymenoptera: Encyrtidae). *Bulletin of Entomological Research* 91(5): 363-367
- Stilmant D, van Bellinghen C, et al. (2008). Host specialization in habitat specialists and generalists. *Oecologia* 156(4): 905-912. doi 10.1007/s00442-008-1036-8
- Suarez RK (1998). Oxygen and the upper limits to animal design and performance. *Journal of Experimental Biology* 201(8): 1065-1072
- Vernon P and Vannier G (1996). Developmental patterns of supercooling capacity in a subantarctic wingless fly. *Experientia* 52(2): 155-158
- Visser ME (1994). The importance of being large - the relationship between size and fitness in females of the parasitoid *Aphaereta minuta* (Hymenoptera, Braconidae). *Journal of Animal Ecology* 63(4): 963-978
- Wajnberg E (2004) Measuring genetic variation in natural enemies used for biological control: Why and How? In: Ehler LE, Sforza R and Mateille T (eds) *Genetics, evolution and biological control*. CABI Publishing, pp. 19-37.

Table 1. Longevity in days (mean \pm SE) for females and males. Cox proportional hazard model was used to compare within each sex (Control at 20°C, 4C: 4°C constant; 4F: 4°C fluctuating; 0C: 0°C constant; and 0F: 0°C fluctuating). Letters represent significant differences ($p = 0.05$). 30 females and 30 males were used for each treatment.

Thermal regime	Females	Males
20°C	25.30 \pm 0.98 a	21.07 \pm 0.67 a
4C	16.50 \pm 0.98 b	14.90 \pm 1.14 c
4F	18.67 \pm 0.71 b	15.73 \pm 1.04 bc
0C	19.07 \pm 1.58 ab	19.73 \pm 1.53 ab
0F	23.38 \pm 1.12 a	19.61 \pm 1.06 ab

Table 2. Effect of different treatments of cold storage on individual size (Control at 20°C, 4C: 4°C constant; 4F: 4°C fluctuating; 0C: 0°C constant; and 0F: 0°C fluctuating). Data are presented as mean ± (SE). Different letters indicate significant differences among treatments ($p = 0.05$). 30 females and 30 males were used for each treatment.

	20°C	4C	4F	0C	0F
Female size (mm)	0.60 ± 0.01 a	0.57 ± 0.01 a	0.56 ± 0.01 a	0.51 ± 0.01 b	0.57 ± 0.01 a
Male size (mm)	0.54 ± 0.01 a	0.51 ± 0.01 a	0.52 ± 0.01 a	0.44 ± 0.01 b	0.51 ± 0.01 a

Table 3. Summary of significant negative effects in each temperature on survival and fitness traits (-: affected, +: not different from the control). Control at 20°C, 4C: 4°C constant; 4F: 4°C fluctuating; 0C: 0°C constant; and 0F: 0°C fluctuating.

	20°C	4C	4F	0C	0F
Survival	+	-	+	-	+
Size	+	+	+	-	+
Longevity	+	-	-	+	+
Egg load	+	+	+	+	+
Fat content	+	-	--	-	--

Figure legends

Fig. 1 Emergence rate of *A. ervi* after storage for 4 weeks at 4°C and 0°C. Data are presented as percentage \pm SE. Letters represent significant differences among the temperatures and according to thermal regimes (T: control, C: constant and F: fluctuating).

Fig. 2 Mean \pm SE of fat content of the nymphs. Letters represent significant differences among the temperatures (20, 4, and 0°C), and according to thermal regimes (T: control, C: constant and F: fluctuating). 20 mummies were used for each treatment.

Fig. 1

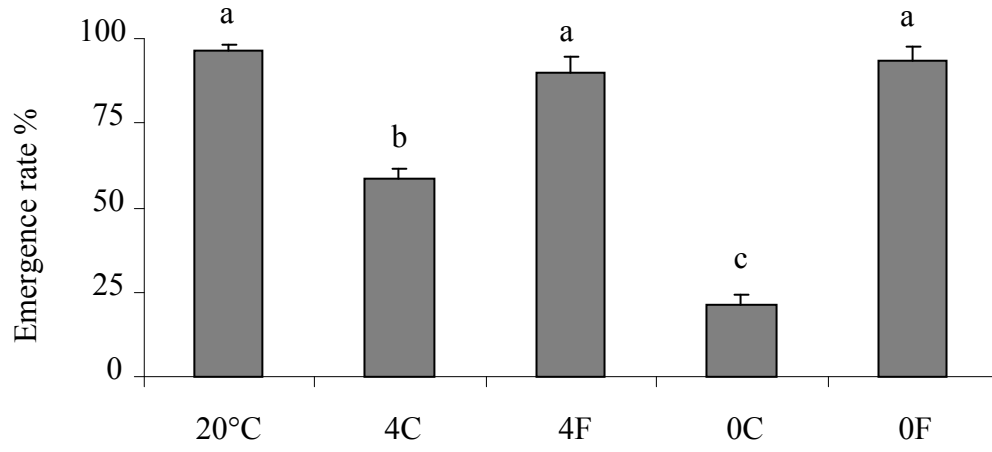
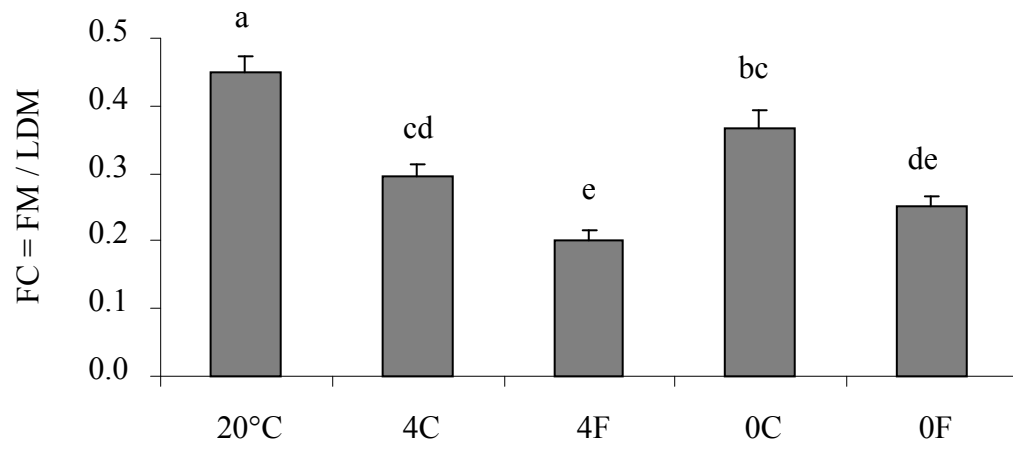


Fig. 2



DISCUSSION GENERALE

Lors de cette thèse, différents effets du stockage au froid ont été étudiés, en faisant varier les conditions de stockage : température de stockage au-dessus ou au-dessous du seuil de développement, régime de température fluctuant ou constant, durée de stockage induisant ou non de la mortalité. Pour chacune de ces conditions de stockage, les effets du stress ont été évalués sur différents traits de vie, comme la longévité, la fécondité à l'émergence et la fécondité totale, la capacité d'accouplement ou le sexe ratio des descendants, et sur différents paramètres physiologiques comme la quantité de lipides. L'originalité de ce travail a donc été de comparer de façon très large une grande variété de traitements de stockage au froid et d'évaluer leurs effets sur la fitness des survivants.

Les principaux résultats montrent que:

- Bien que la température du seuil de développement ait été évaluée à 6.6°C (Sigsgaard 2000), le développement se poursuit très lentement à la température de stockage de 4°C. Il y a donc peu de différences dans les traits de vie pour des températures de stockage proches du seuil de développement, que ce soit au-dessus ou en-dessous.
- Les régimes de température fluctuants améliorent considérablement le taux de survie (principalement après quatre semaines de stockage), mais les parasitoïdes stockés dans ces conditions consomment une plus grande proportion de lipides. Pour une longue durée de stockage (4 semaines), les régimes fluctuants à basse température (0°C) permettent d'obtenir le meilleur taux de survie associé aux meilleures performances de fitness et cet aspect n'avait jamais été mis en évidence auparavant. Il ouvre une voie de recherche qui pourrait avoir des applications potentiellement importantes en lutte biologique, en utilisant la combinaison d'une basse température avec un régime thermique fluctuant.
- Lorsque le taux de mortalité lié au stockage est négligeable, le premier trait de vie atteint est la longévité. La fécondité n'est pas modifiée. Les capacités d'accouplement des mâles sont relativement vite affectées, induisant des conséquences au niveau du sexe-ratio des descendants.
- Lorsque le taux de mortalité est important, on peut observer la sélection d'individus résistants au stockage, dont les performances sont identiques à celle des témoins non stockés. Cependant, ces individus ont une taille réduite par rapport à celle des témoins, ce qui compromet leur utilisation potentielle en lutte biologique.

- Lors du stockage au froid, les individus de plus grande taille sont plus affectés par ce stress que les individus de petite taille. Ce point n'avait encore jamais été mis en évidence à notre connaissance ; sachant que chez les parasitoïdes, les individus les plus grands ont une meilleure fitness, ce point peut avoir des répercussions négatives en lutte biologique.
- Grâce à un modèle de biologie des populations, il est possible de comparer les impacts négatifs de chaque régime de stockage, donnant ainsi aux producteurs d'agents de lutte biologique toutes les informations nécessaires pour le choix du régime de stockage.

Ces différents points seront discutés successivement, en traitant tout d'abord les effets des températures au-dessus et en-dessous du seuil de développement, les effets des traitements fluctuants, les coûts physiologiques du stockage au froid, les effets de sélection liés au stockage au froid, les effets du stockage en fonction de la taille des individus. Cette discussion se terminera par une partie sur les applications possibles de ces résultats dans le domaine de la production intensive d'agents de lutte biologique dans le cadre de la lutte biologique par lâchers inondatifs. Dans ce domaine appliqué, le but sera de mettre en évidence les qualités et les inconvénients de chacun des différents traitements de stockage au froid.

L'effet du seuil de développement

La température de stockage au froid joue un rôle important sur la survie des individus et sur les performances des émergents. De façon générale, il a été démontré que plus la température est basse, plus les effets sont négatifs (Pitcher *et al.* 2002; Lopez & Botto 2005; Pandey & Johnson 2005). Les dommages liés à ces basses températures de stockage sont à mettre en relation avec l'action du froid sur les insectes en milieu naturel, où là aussi, il a été mis en évidence des conséquences négatives croissantes de l'exposition au froid avec la décroissance des températures (Salt 1961).

Généralement, les températures qui ont été utilisées pour le stockage au froid se situent à proximité du seuil minimum de développement (T_0) (Colinet 2007), qui est défini comme la température à laquelle le développement d'un insecte peut s'effectuer. En général, les chercheurs ont tenté d'utiliser des températures au-dessus et au-dessous de T_0 dans l'objectif de trouver une condition optimale pour stocker les parasitoïdes. La gamme de températures utilisées pour le stockage est comprise entre -5 et +15°C. Chez *A. ervi*, la température de développement (nymphe-adulte) a été estimée à 6.6°C (Sigsgaard 2000). Lors de cette thèse,

les momies ont été exposées à des températures de 7, 4 et 0°C, pour 1, 2 ou 4 semaines de stockage.

Pour une température au-dessus de T_0 , nous observons que le développement se poursuit effectivement. Nous avons constaté que les individus commencent à émerger pendant le stockage et plus précisément à partir de 17 jours de stockage à 7°C. En dehors de ce point qui limite l'utilisation de cette température pour la fonction de stockage, il n'y a pas de différences majeures sur les traits affectés par un stockage à 7 ou à 4°C. En dehors de notre étude, l'effet d'une température de stockage au-dessus et au-dessous de T_0 varie selon l'espèce étudiée. Par exemple, il a été démontré que la survie de momies d'*Aphidius colemani* stockées 2 et 3 semaines à une température au-dessus de T_0 (4°C) était moindre qu'à une température au-dessous de T_0 (2°C) (Colinet *et al.* 2006a). Au contraire, Pandey et Johnson (2005) ont constaté que le taux d'émergence d'*Anagyrus ananatis* après 2 et 4 semaines à 14.8°C était respectivement de 94.2 et de 90.2 %, tandis qu'il a diminué à 46.1 et 7 % respectivement à 10,1°C (au-dessus et au-dessous de T_0 qui est 12.65°C). De façon générale, il existe une énorme variation inter-spécifique concernant les capacités des différentes espèces de parasitoïdes à résister à une basse température ou une durée de stockage donnée.

Nos résultats montrent aussi qu'à 4°C, qui est pourtant considérée comme une température au-dessous du seuil de développement, le développement se poursuit encore très lentement. Ceci s'observe par le fait que le temps écoulé entre le moment où les momies sont remises à 20°C et l'émergence des adultes après le stockage est plus faible pour des individus stockés à 4°C que pour les témoins. La valeur $T_0 = 6.6^\circ\text{C}$ (Sigsgaard 2000), a été estimée au moyen de la méthode « **x-intercept** » (Campbell *et al.* 1974), qui estime que la relation entre $y =$ taux de développement et $x =$ la température, est une relation linéaire. L'intersection de l'axe x de la régression est utilisée comme estimateur du (T_0). Par contre, cette valeur pourrait être surestimée, à cause d'une extrapolation dans un endroit où la relation n'est probablement pas linéaire (Walgama & Zalucki 2006). La méthode de Lactin *et al.* (1995), qui considère que la relation entre le taux de développement et la température est non linéaire est probablement plus précise pour estimer la valeur de T_0 , Ce modèle pourrait probablement expliquer nos résultats pour le développement des nymphes à 4°C.

Les régimes de températures fluctuantes et constantes

Comme dans plusieurs études précédentes sur les parasitoïdes (Rudolf *et al.* 1993; Colinet *et al.* 2006b; Chen *et al.* 2008b), les traitements à température fluctuante ont prouvé leur efficacité pour augmenter le taux de survie des individus stockés. Chez *A. ervi*, le taux de

survie ne commence à être affecté qu'à partir de 2 semaines de stockage et cet effet devient significatif pour 4 semaines de stockage à température constante (à 4 ou à 0°C puisque cette durée de stockage n'est pas possible à 7°C). Pour 4 semaines de stockage, nous avons remarqué qu'après un stockage à température fluctuante, le taux de survie était supérieur à 90% et donc non significativement différent des témoins, alors que lors du stockage à température constante, le taux de survie était significativement diminué (respectivement 58 et 21% de survivants pour des températures de stockage de 4 et 0°C). Les effets positifs des traitements à températures fluctuantes sur le taux de survie ont aussi été mis en évidence chez d'autres espèces d'insectes. Par exemple, le taux d'émergence des momies d'*Aphidius colemani* après 2 et 3 semaines de stockage à 4°C, est passé de 70 et 45% à 90 et 85% respectivement avec un traitement à température fluctuante (Colinet *et al.* 2006b). De même, l'effet positif de la température fluctuante a été vérifié chez plusieurs insectes : *A. ervi* (Colinet & Hance 2010) ; *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera, Tenebrionidae) (Renault *et al.* 2004), *Orchesella cincta* (Collembola, Entomobryidae) (Nedved *et al.* 1998), *Musca domestica* (Diptera, Muscidae) ; *Lucilia cuprina*, et *L. sericata* (Diptera, Calliphoridae) (Leopold *et al.* 1998), et les deux espèces de prédateurs *Orius majusculus* et *O. laevigatu* (Heteroptera, Anthocoridae) (Rudolf *et al.* 1993).

En dehors de cet impact significatif sur le taux de survie, les températures fluctuantes ont aussi un effet positif sur les traits de vie liés à la fitness (chapitre 3). En effet, lorsque le taux de survie est identique et non significativement différent de celui des témoins non stockés, des coûts physiologiques apparaissent dans les traitements de stockage à température constante (baisse de longévité des femelles, sexe-ratio davantage biaisé vers les mâles), mais pas dans les traitements à température fluctuante et cela autant pour des courtes (1 et 2 semaines) que pour une longue durée de stockage (4 semaines).

Lors de cette thèse, nous avons mis en évidence un fait totalement nouveau (chapitre 6) : Pour un même taux de survie, les individus survivant à un stockage au froid d'une durée de 4 semaines sont beaucoup plus performants lorsque la température de stockage a été de 0°C que de 4°C. En effet, à 4°C les individus subissent une perte de longévité marquée, ce qui n'est pas le cas à 0°C. Dans les deux cas, les nymphes de parasitoïdes stockées ont subi une remontée journalière de 2h à 20°C, donc un écart de température plus important pour les individus stockés à 0°C. Une explication pourrait être que l'activité métabolique des nymphes stockées à 0°C serait plus limitée de celle des nymphes stockées à 4°C, leur permettant ainsi de mieux résister au stress (Hoffmann & Parsons 1989). En effet (voir paragraphe précédent), à 4°C, le développement se poursuit, bien que très lentement.

Parallèlement, nous avons observé que la consommation des réserves lipidiques est plus marquée dans les traitements fluctuants que dans les traitements constants quelle que soit la température (4 et 0°C) après 4 semaines, mais que plus de lipides ont été consommés à 4°C qu'à 0°C pour les traitements fluctuants, ce qui confirme qu'à 0°C, le développement et la consommation énergétique sont réduits au minimum. Nous avons donc lié cette amélioration du taux de survie à la surconsommation des réserves lipidiques pendant le stockage par rapport aux traitements constants (Chapitre 6). Ces coûts des traitements fluctuants, qui sont ici mis en évidence pour la première fois pourraient être responsables de la perte de longévité observée pour les traitements fluctuants à 4°C. De plus, bien que l'utilisation des lipides dans le traitement fluctuant à 0°C n'a pas affecté la longévité ni la charge en œufs à l'émergence, cette utilisation des lipides devrait se refléter sur un autre trait de vie, comme par exemple la fécondité totale ou la mobilité qui n'ont pas été mesurés dans ce chapitre (6). En effet, le chapitre 3 avait permis de mettre en évidence une corrélation entre la fécondité à l'émergence et la fécondité totale dans les traitements témoins et de deux semaines de stockage, mais il est possible que cette corrélation ne se retrouve plus après 4 semaines de stockage.

Cette constatation est cependant à nuancer, car pour une température de stockage de 7°C et pour une courte durée de stockage (une ou deux semaines) (chapitre 3), la consommation de lipides est moins importante dans les traitements fluctuants que dans les traitements constants.

Pour expliquer cet impact très positif des températures fluctuantes, des auteurs émettent l'hypothèse que la brève remontée de température journalière lors du stockage aurait deux effets : d'une part, un ralentissement de l'accumulation des dégâts, l'intensité des stress cumulés étant donc *a priori* plus importante en conditions constantes qu'en conditions fluctuantes (Renault *et al.* 2004; Colinet 2007). De plus, plusieurs mécanismes physiologiques ont été détectés lors d'un régime fluctuant : glycolyse, synthèse et conversion de l'ATP, et production des protéines de choc thermique (HSP70/HSP90), qui peut jouer un rôle dans le métabolisme énergétique (Colinet *et al.* 2007a). Kostal *et al.* (2007) ont démontré également une augmentation dans la concentration de l'homéostasie ionique (K⁺) lors d'une exposition constante au froid plus que lors d'une exposition fluctuante.

Les individus dans les régimes constants sont exposés 24h/jour, alors que les individus dans les régimes fluctuants sont exposés 22h/jour seulement. D'autre part, la courte remontée de température permettrait des opportunités périodiques de réparation des dégâts physiologiques ou d'élimination des produits toxiques accumulés pendant le stockage (Leopold *et al.* 1998). Ces effets pourraient être liés à une augmentation de l'activité

métabolique temporaire, qui serait responsable de la baisse des dommages liés à l'exposition au froid (Colinet *et al.* 2006b).

La consommation de lipides observée dans les traitements à température fluctuantes de longue durée (4 semaines) pourrait être utilisée pour les processus de réparation ou de récupération physiologiques mentionnés ci-dessus. Il reste à déterminer pourquoi ces processus seraient consommateurs d'énergie à 4°C, mais beaucoup moins à 0 ou 7°C.

Les coûts physiologiques

Lorsque des lots d'individus d'une population sont soumis à un stress d'intensité croissante, ceux qui sont soumis à un stress de faible intensité ne subissent pas de mortalité. Ces individus peuvent néanmoins montrer des pertes de fitness suite à l'altération de certains traits comme la longévité ou la fécondité. Il s'agit alors de coûts physiologiques induits par le stress. Si l'intensité du stress augmente, une certaine partie des individus vont mourir, et d'autres vont survivre, mais ces survivants peuvent eux aussi avoir certaines composantes de leur fitness altérées. Ces survivants ne représentent qu'une certaine proportion de la population (les individus les plus résistants au stress appliqué) et ne sont donc pas représentatifs de la population totale. Dans ce second cas, il est difficile de distinguer les coûts physiologiques des coûts liés à la sélection (Amice *et al.* 2008).

Dans cette thèse, un stockage au froid de courte durée (1 à 2 semaines), n'induisant pas de mortalité a été appliqué afin de déterminer quels seraient les premiers traits de vie à être affectés par le stress. Nos résultats ont mis en évidence que la fécondité des femelles n'était pas affectée, que ce soit la fécondité à l'émergence ou la fécondité totale. Par contre, la longévité des femelles a été affectée. Chez les parasitoïdes, un compromis évolutif a été mis en évidence entre la fécondité et la longévité : en effet, la majorité des espèces de parasitoïdes ne sont pas capables de synthétiser des lipides et ceux-ci constituent donc une ressource limitante qui est affectée soit à la reproduction, soit à la maintenance. Toute augmentation d'un de ces traits se fait au détriment de l'autre (Ellers 1996). Comme nos résultats et ceux de Colinet *et al.* (2006a), ont montré que le stockage au froid était consommateur d'énergie, si la fécondité n'est pas affectée, c'est que c'est l'énergie consacrée à la maintenance qui a été utilisée lors du stockage au froid, induisant une baisse de longévité. Cette baisse de longévité n'affecte pas la fitness, puisque chez cette espèce, les œufs sont pondus en début de vie (Stilmant 1994). Chez les mâles, la longévité n'est pas affectée. Cependant, le sexe ratio des descendants des mâles et femelles stockés est affecté, et moins de femelles sont produites.

Comme les femelles non fécondées peuvent produire des descendants mâles, le fait que le sexe ratio soit biaisé vers les mâles après stockage est probablement plus lié à un problème au niveau des mâles stockés qu'au niveau des femelles et ce problème affecterait ainsi davantage la fitness des mâles que celle des femelles. Cette variation de sexe-ratio pourrait également être liée au changement de comportement chez les femelles après le stockage, qui pourrait affecter l'accouplement entre les deux sexes.

Concernant la différence de résistance entre sexes des individus de façon plus générale, certaines études ont montré que les mâles étaient plus sensibles au stress que les femelles. Colinet *et al.* (2006) ont démontré chez *A. colemani* que la survie des femelles après le stockage des momies était plus élevée que celle de mâles, et les auteurs relient cette meilleure survie à un stock de lipides plus important chez les femelles que chez les mâles. De même, Amice *et al.* (2008) ont également indiqué que chez *A. picipes*, seuls les mâles stockés ont montré une asymétrie dans le nombre d'antennomères. Les mâles seraient plus sensibles au stress que les femelles pour différentes causes : d'une part, chez les parasitoïdes ils sont majoritairement plus petits que les femelles et ont donc potentiellement moins d'énergie pour résister au stress du stockage au froid. D'autre part, ils sont haplodiploïdes, alors que les femelles sont diploïdes : le double lot de chromosomes chez les femelles pourrait aider à réparer les dommages causés sur l'ADN par recombinaison (Roux *et al.* 2010).

La sélection

Lorsque des individus sont soumis à un stress important, induisant un fort taux de mortalité, les survivants ont parfois des performances identiques voire supérieures aux témoins. Par exemple, Pandey et Johnson (2005) ont constaté que le stockage des momies d'*Anagyrus ananatis* à 10,1°C pendant quatre semaines a fortement diminué le taux de survie, mais ils ont montré que les survivants n'ont pas souffert d'une baisse dans les différents traits liés à leur fitness (longévité, fécondité). Ces individus ont été nommés « individus extrêmes » au sens de Danks (1983). Ils représentent la faible proportion d'individus particulièrement résistants au stress appliqué. En appliquant un stress de grande durée et de forte intensité (stockage de 4 semaines à 0°C), nous avons essayé d'obtenir de tels individus. Les survivants n'ont effectivement pas souffert d'une réduction de fitness et leur performance est égale à celle des témoins. Cependant ces individus avaient une taille réduite par rapport aux témoins. Ce résultat (Chapitre 6) confirme le résultat obtenu dans l'chapitre 4, qui montre que les individus les plus grands sont plus affectés par le stockage au froid que les plus petits. Dans ce processus de sélection, on peut penser que les individus de plus grande taille sont morts, et

que les seuls survivants sont les individus de petite taille. Il est évident que les grands individus ont plus d'eau dans leur corps que les petits. Dans une situation où les températures sont encore plus basses, ils pourraient donc souffrir davantage de la congélation de l'eau dans leurs tissus, entraînant leur mort. Il a été constaté que la capacité de surfusion augmente avec la diminution de la taille chez *A. colemani* (Colinet *et al.* 2007b), en raison de la possibilité d'augmentation de la formation de glace avec la taille corporelle (Lee & Costanzo 1998).

En résumé, cette capacité d'adaptation des petits individus à supporter le froid et avoir une bonne performance après le stockage, pourrait être liée à la variation génétique qui existe entre les individus dans une population (Hartel 1994). Cette variation pourrait permettre de sélectionner des individus, et donc améliorer l'efficacité des insectes relâchés contre les ravageurs (Wajnberg 1991).

Les grands individus sont plus affectés que les petits

Après les différents traitements de stockage au froid, nous observons que la corrélation entre la taille et différents traits de fitness (longévité des individus non nourris, mâles et femelles, fécondité à l'émergence, fécondité totale) est moins forte après une semaine de stockage et disparaît généralement totalement à partir de deux semaines de stockage. Ce phénomène s'observe quelle que soit la température de stockage et quel que soit le type de traitement. Les données présentées dans la publication concernent les traitements d'une et deux semaines de stockage, pour un stockage à des températures constantes de 7 et 4°C, mais les résultats semblent plus généraux. En effet, les mêmes tendances se retrouvent pour un stockage à 0°C, et pour les stockages à des températures fluctuantes.

La perte de corrélation observée implique que les grands individus sont plus affectés par le stockage au froid que les petits. Deux cas se présentent : pour la longévité des femelles et la fécondité totale, les grandes femelles sont nettement plus affectées que les petites. Pour la charge en oeufs à l'émergence, les petites femelles présentent une fécondité supérieure à celle des témoins, alors que les grandes femelles présentent une charge en œufs inférieure à celle des témoins. Enfin, pour les mâles, la longévité (seul trait de fitness mesuré chez les mâles) des grands mâles est nettement moins affectée que celle des grandes femelles.

Nous avons mis ces résultats en relation avec l'utilisation des réserves lipidiques pendant le stockage au froid (Chapitre 4). En effet, il a déjà été observé que l'exposition au froid correspond à un stress et que pour y résister, les individus utilisent une partie de leurs réserves lipidiques (Chen & Walker 1994; Colinet *et al.* 2006a). Ceci montre que les fonctions vitales ne sont pas stoppées pendant le stockage au froid, et cela même pour une

température de 4°C, pourtant proposée comme température au-dessous du seuil de développement. Nous observons que les grands individus au stade nymphal utilisent une plus grande proportion de leurs réserves lipidiques que les petits pour résister au stockage. Même *si a priori*, les grands individus réussissent à accumuler plus de réserves lipidiques en quantité absolue que les petits à l'issue de leur développement larvaire (Rivero & West 2002), il semblerait qu'à l'issue du stockage, ces réserves ne leur permettent pas de maintenir leurs paramètres de fitness, à cause d'une utilisation plus rapide de ces réserves énergétiques chez les grands adultes que chez les petits. Cet épuisement des réserves énergétiques pourrait expliquer les dommages qui sont observés chez les grands individus.

Cette utilisation plus rapide des lipides par les grands individus pourrait être liée au taux de métabolisme. Deux hypothèses physiologiques contradictoires existent actuellement liant le taux de métabolisme et la taille. Dans la première, appelée « Absolute Energy Demand hypothesis » (AED), les individus de grande taille ont besoin d'une plus grande quantité d'énergie pour leurs fonctions vitales (Blanckenhorn *et al.* 1995; Blanckenhorn 2005; Reim *et al.* 2006a), car leur taux de métabolisme serait proportionnellement plus élevé (Calder 1984; Gillooly *et al.* 2001). Dans la seconde, appelée « Relative Efficiency hypothesis » (RE), les grands individus utiliseraient de façon plus efficace leur énergie (Arnett & Gotelli 2003; Reim *et al.* 2006b), grâce à un taux métabolique proportionnellement plus bas (Lehmann *et al.* 2000; Bokma 2004; Glazier 2005; Blanckenhorn *et al.* 2007). Nos résultats montrent qu'*A. ervi* relevait de l'hypothèse AED, qui avantage les petits individus. Rivero & West (2002), ont soumis des insectes parasitoïdes (*Nasonia vitripennis*) à un stress énergétique relativement similaire, non pas à l'état nymphal mais à l'état adulte. Ils montrent que les petits individus meurent plus vite suite au fait qu'ayant moins de lipides à l'émergence, ils épuisent plus rapidement cette quantité de lipides. Par contre, ils montrent que proportionnellement, les grands individus utilisent plus rapidement leurs lipides pour résister au stress lié au jeûne. Ces résultats montrent qu'un même type de stress (énergétique), appliqué au stade adulte ou au stade nymphal peut avoir les mêmes conséquences (consommation plus rapide d'énergie par les grands individus). Les conséquences de ces résultats pour la lutte biologique seront discutées dans le dernier paragraphe de discussion.

Le fait que pour la charge en œufs à l'émergence, les femelles de petite taille présentent une charge plus importante que les femelles témoins pourrait s'expliquer grâce au compromis longévité-fécondité. En cas de stress induisant une consommation d'énergie, la longévité sera potentiellement réduite (Ismail *et al.* 2010). En conséquence, il est probable qu'en cas de stress, les femelles investissent leur énergie vers une fécondité potentielle à

l'émergence supérieure, ce qui pourrait les conduire à avoir déposé leurs œufs plus tôt dans leur vie, réduisant ainsi les conséquences d'une longévité réduite (Chpitre 2). Une tendance à l'augmentation de l'indice d'ovogénie (et donc d'une fécondité plus précoce dans la vie) a été modélisée par Denis *et al.* (Soumis) dans le cas d'une augmentation de température liée aux changements climatiques, car cette augmentation des températures induit une consommation plus rapide des réserves énergétiques. Pour les femelles de grande taille, tous les traits de fitness subissent une réduction, que ce soit la longévité, la charge en œufs à l'émergence ou la fécondité totale. Il n'est pas réellement possible de comparer quel trait subit la baisse la plus importante, mais cela montre bien que les femelles de grande taille subissent un stress beaucoup plus dommageable que celles de petite taille, qui peuvent diminuer les conséquences du stress sur la fitness en modifiant leur allocation d'énergie à l'émergence.

Pour les mâles, le seul trait de fitness mesuré a été la longévité, et nous avons mis en évidence que la corrélation taille-longévité n'était pas perdue après un stockage de deux semaines à 4°C et qu'elle était relativement proche d'être significative ($p = 0.14$) pour un stockage de deux semaines à 7°C. Cela va dans le sens d'un effet moindre de ce stress sur les grands mâles que sur les grandes femelles. Plusieurs facteurs pourraient expliquer ce résultat : d'une part, les gamètes des mâles étant moins coûteux à produire que ceux des femelles (Ernsting & Isaaks 2002), le compromis longévité-fécondité ne s'applique probablement pas de la même façon chez eux. D'autre part, les mâles étant généralement plus petits et pouvant se développer dans des hôtes de plus petite taille (Charnov *et al.* 1981; Seidl & King 1993), la contrainte physiologique induite par ce stress énergétique est probablement beaucoup moins forte chez eux.

Par contre, si les mâles semblent perdre moins de réserves lipidiques que les femelles suite au stockage au froid, les résultats de la première partie de cette thèse (Ismail *et al.* 2010) montrent que les mâles subissent potentiellement une plus grande perte de fitness que les femelles suite au stockage, car le sexe ratio des descendants des couples stressés est plus fortement biaisée vers les mâles. Il avait été suggéré que cette perte de fitness pouvait être liée au fait que les mâles, plus petits, avaient moins de lipides, mais il semblerait maintenant que les aspects dommageables du stockage soient plus liés aux atteintes par le froid qu'aux réserves lipidiques.

Impact des résultats de cette thèse pour les programmes de lutte biologique

Pour assurer le succès d'un programme de lutte biologique, il faut produire des parasitoïdes de bonne qualité. On pourrait résumer la qualité d'un individu d'après les traits de fitness

suivants: une bonne capacité à rechercher un partenaire sexuel et à s'accoupler (pour les deux sexes), une bonne fécondité pour les femelles, et la capacité pour les femelles à produire des descendants femelles en grand nombre (sexe-ratio) et tôt dans leur vie. Dans nos études, nous avons montré que pour deux semaines de stockage à 7°C (les mêmes résultats sont obtenus à 4°C), les individus des deux sexes conservaient une bonne capacité d'accouplement et que la fécondité des femelles d'*A. ervi* n'était pas affectée. En revanche, nous avons observé que la longévité était affectée et que le sexe ratio de la génération suivante était davantage biaisé vers les mâles. Le fait que la longévité soit réduite n'est pas forcément gênant car la plupart des œufs sont pondus en début de vie. Néanmoins, cette mesure de la longévité se fait dans une enceinte réduite et ne prend pas en compte le déplacement des individus. La quantité d'énergie qui est investie dans la longévité pourrait aussi être représentative de la quantité d'énergie restant pour les activités extérieures à la reproduction. Sur le terrain, cette baisse de longévité observée dans les conditions de laboratoire pourrait correspondre à une diminution de la potentialité de l'individu à se disperser, ce qui là est plus dommageable pour la lutte biologique qu'une simple baisse de la longévité. La diminution observée dans le sexe ratio pourrait réduire l'efficacité d'un programme de lutte biologique, puisque ce sont uniquement les femelles des parasitoïdes qui peuvent attaquer les ravageurs (Godfray 1994). Notre étude sur le taux d'accroissement confirme également que le nombre de femelles a diminué après le stockage. Dans cette étude, nous avons mesuré : le taux de fécondité net (R_0), et la fécondité cumulée comme des estimateurs pour le taux d'accroissement. En effet, il a été démontré que la fécondité représente un bon estimateur de l'impact des traitements pour la croissance de la prochaine génération car elle prend en compte le nombre total de femelles (Carey 1993). Nous avons confirmé que pour une génération, il est plus pratique d'utiliser les paramètres de fécondité cumulée pour estimer le taux de croissance d'une population chez les parasitoïdes que le r_m . En fait, la croissance d'une population dépend fondamentalement de deux paramètres biologiques : la précocité de la reproduction et la fécondité de la jeune femelle (van Impe & Hance 1993; Kennedy & Hance 1995). Nos résultats montrent également que la température de 0°C est une température intéressante pour stocker des momies d'*A. ervi*, mais comme selon les durées, elle produit aussi des dommages, il est important d'étudier les conséquences du stockage au froid à cette température de manière plus approfondie.

Sachant que la taille est généralement corrélée positivement avec la fitness (Rivero & West 2002), l'obtention de grands individus dans un programme de la lutte biologique pourrait être très importante (West *et al.* 1996; Ellers *et al.* 1998). Nos résultats ont montré pour la première fois l'absence de corrélation entre la taille et la fitness après deux semaines

de stockage, autrement dit que les adultes les plus grands étaient plus affectés que les individus les plus petits par le stockage au froid (Chapitre 4) et que les survivants après une longue exposition à 0°C, avaient une taille réduite (Chapitre 6). Cependant, comme la ponte semble être plus précoce puisque le nombre d'œufs à l'émergence est plus grand chez ces survivants de petite taille, une ponte précoce pourrait compenser les impacts potentiellement négatifs d'une taille réduite.

En conclusion, un stockage au froid de faible durée (2 semaines maximum) à des températures peu stressantes (7 ou 4°C) produit des individus de taille équivalente aux témoins mais dont les grands individus auront une fitness réduite, et un stockage au froid de durée supérieure (ou à 0°C) produira des individus de taille réduite. La fitness de ces individus de petite taille ne semble cependant pas affectée (du moins à partir des traits mesurés dans cette étude).

Perspectives

Cette thèse a ouvert plusieurs portes de recherche (fondamentale et appliquée). Nous nous sommes limités à étudier ici les effets de la température, mais il serait également nécessaire d'étudier l'effet de la photopériode, de la diapause et du taux d'humidité sur le stockage. Par exemple, l'étude de Ganteaume *et al.* (1995) a montré que le stockage des nymphes d'*Encarsia formosa* à 9°C pendant 15 jours en photopériode longue (15L : 9D) a amélioré la longévité des individus émergents par rapport au stockage en photopériode courte (11L : 13D). Il est évident que la photopériode joue un rôle chez les insectes pour l'entrée en diapause (Danks 1994; Yadav *et al.* 2008). Il a été montré que les individus diapausants ont la capacité de supporter le froid plus facilement que les non diapausants (Langer & Hance 2000). Pour cela, il serait nécessaire de mieux connaître les conditions d'induction de la diapause.

L'humidité est un facteur qui a également été peu étudié lors du stockage au froid. Cependant, il semble jouer un rôle positif dans l'amélioration de la survie après stockage au froid. Levie (2002) a démontré que le taux d'émergence d'*A. rhopalosiphi* n'était pas diminué après 3 semaines d'exposition des momies à 3°C avec un taux d'humidité de 80%, alors qu'avec 30% d'humidité seulement, le taux d'émergence diminuait dès la 2^{ème} semaine. De même, Balthazar (2009) a montré la possibilité de stocker les momies d'*A. ervi* jusqu'à 7 semaines à 2°C avec 100% d'humidité tout en conservant un bon taux d'émergence. Les deux études ont montré l'effet de l'humidité sur le taux d'émergence. Il serait donc intéressant et important de voir l'effet de ces traitements sur les traits de fitness.

Nous avons démontré une diminution significative du sexe ratio (qui est davantage biaisé vers les mâles dans la génération suivante). On a relié cette diminution à une quantité ou une qualité moindre des spermatozoïdes chez les mâles (Chapitre 3) et cette diminution pourrait réduire l'efficacité d'un programme de lutte biologique. Pour cela, il serait important d'évaluer plus précisément les coûts du stockage sur les mâles en étudiant la quantité et la qualité de spermatozoïdes. Il serait également important d'évaluer leur viabilité en relation avec le comportement reproducteur.

Nous avons démontré également la possibilité de disposer d'individus de petite taille résistants présentant de bonnes performances. Ceci nous donne la possibilité de vérifier si cette résistance se maintient sur plusieurs générations, ce qui pourrait améliorer la qualité des individus stockés.

Dans cette thèse, nous avons mis en évidence pour la première fois que les grands individus sont plus affectés après le stockage au froid que ceux de petite taille. On a relié ce cas à la consommation des lipides qui était plus marquée chez les grands que chez les petits. Il serait important de comprendre quel est le lien entre la taille, le taux de métabolisme, les réserves lipidiques et la fitness.

Plusieurs aspects physiologiques pourraient être étudiés dans le but de comprendre les causes et les mécanismes responsables des blessures indirectes causées par le froid, et les mécanismes de réparation. Un premier point est celui de l'expression des HSPs (Heat Shock Protéins), qui sont des protéines produites après un stress : il existe un lien entre les HSPs et la température (choc à la chaleur ou au froid) ; le stockage, qui est considéré comme un stress aux basses températures pendant une longue durée, pourrait influencer la production de ces protéines.

Un autre point est la production des polyols qui sont synthétisés chez les insectes et qui concourent à une meilleure adaptation au froid (Bale 2002). Par exemple, il a été trouvé une accumulation de sorbitol et de ribitol chez l'Hétéroptère *Pyrrhocoris apterus* lorsque la température diminue au-dessous de 5°C et de 0°C.

Références bibliographiques

- Abdel-Salam A.H. & Abdel-Baky N.F. (2000). Possible storage of *Coccinella undecimpunctata* (Col., Coccinellidae) under low temperature and its effect on some biological characteristics. *Journal of Applied Entomology-Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie*, 124, 169-176.
- Amice G., Vernon P., Outreman Y., van Alphen J. & van Baaren J. (2008). Variability in responses to thermal stress in parasitoids. *Ecological Entomology*, 33, 701-708.
- Amir-Maafi M. & Chi H. (2006). Demography of *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) on two *pyralid* hosts (Lepidoptera: Pyralidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 99, 84-90.
- Andreadis S.S., Milonas P.G. & Savopoulou-Soultani M. (2005). Cold hardiness of diapausing and non-diapausing pupae of the European grapevine moth, *Lobesia botrana*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 117, 113-118.
- Arnett A.E. & Gotelli N.J. (2003). Bergmann's rule in larval ant lions: testing the starvation resistance hypothesis. *Ecological Entomology*, 28, 645-650.
- Arrese E.L. & Soulages J.L. (2010). Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology*, 55, 207-225.
- Askew R.R. (1971). *Parasitic insects*. Heinemann Educational Books, London.
- Askew R.R. & Shaw M.R. (1986). Parasitoid communities: their size, structure and development. In: *Insect parasitoids* (eds. Waage JK & Greathead D). Academic Press London, pp. 225-264.
- Atlihan R. & Chi H. (2008). Temperature-dependent development and demography of *Scymnus subvillosus* (Coleoptera: Coccinellidae) reared on *Hyalopterus pruni* (Homoptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology*, 101, 325-333.
- Ayvaz A., Karasu E., Karaborklu S. & Tuncbilek A.S. (2008). Effects of cold storage, rearing temperature, parasitoid age and irradiation on the performance of *Trichogramma evanescens* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Journal of Stored Products Research*, 44, 232-240.
- Bale J.S. (1987). Insect cold hardiness - freezing and supercooling - an ecophysiological perspective. *Journal of Insect Physiology*, 33, 899-908.
- Bale J.S. (1991). Insects at low temperature - a predictable relationship. *Functional Ecology*, 5, 291-298.

- Bale J.S. (1996). Insect cold hardiness: A matter of life and death. *European Journal of Entomology*, 93, 369-382
- Bale J.S. (2002). Insects and low temperatures: from molecular biology to distributions and abundance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 357, 849-861.
- Bale J.S., Hansen T.N. & Baust J.G. (1989a). Nucleators and sites of nucleation in the freeze tolerant larvae of the gallfly *Eurosta solidaginis* (fitch). *Journal of Insect Physiology*, 35, 291-&.
- Bale J.S., Hansen T.N., Nishino M. & Baust J.G. (1989b). Effect of cooling rate on the survival of larvae, pupariation, and adult emergence of the gallfly *Eurosta solidaginis*. *Cryobiology*, 26, 285-289.
- Bale J.S., Harrington R. & Clough M.S. (1988). Low temperature mortality of the peach potato aphid *Myzus persicae*. *Ecological Entomology*, 13, 121-129.
- Bale J.S. & Hayward S.A.L. (2010). Insect overwintering in a changing climate. *Journal of Experimental Biology*, 213, 980-994.
- Balthazar C. (2009). La résistance au froid d'*Aphidius ervi* (Hymenoptera: Aphidinae). Mémoire de master en bioingénieur, Université catholique de Louvain, Louvain-La-Neuve, p. 133.
- Bayram A., Ozcan H. & Kornosor S. (2005). Effect of cold storage on the performance of *Telenomus busseolae* Gahan (Hymenoptera: Scelionidae), an egg parasitoid of *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre) (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Control*, 35, 68-77.
- Bezemer T.M., Harvey J.A. & Mills N.J. (2005). Influence of adult nutrition on the relationship between body size and reproductive parameters in a parasitoid wasp. *Ecological Entomology*, 30, 571-580.
- Bigler F. (1994). Quality control in Trichogramma production. In: *Biological Control with Egg Parasitoids* (eds. Wajnberg E & Hassan SA). CAB International Oxon, UK, pp. 93-111.
- Blanckenhorn W.U. (2005). Behavioral causes and consequences of sexual size dimorphism. *Ethology*, 111, 977-1016.
- Blanckenhorn W.U., Fanti J. & Reim C. (2007). Size-dependent energy reserves, energy utilization and longevity in the yellow dung fly. *Physiological Entomology*, 32, 372-381.

- Blanckenhorn W.U., Preziosi R.F. & Fairbairn D.J. (1995). Time and energy constraints and the evolution of sexual size dimorphism - to eat or to mate. *Evolutionary Ecology*, 9, 369-381.
- Blanco C.A., Portilla M., Abel C.A., Winters H., Ford R. & Streett D. (2009). Soybean flour and wheat germ proportions in artificial diet and their effect on the growth rates of the tobacco budworm, *Heliothis virescens*. *Journal of Insect Science*, 9:59.
- Boivin G. (1994). Overwintering strategies of egg parasitoids. In: *Biological control with egg parasitoids* (eds. Wajnberg E & Hassan SA). CAB International Wallingford, England, pp. 219-244.
- Boivin G. (2001). Parasitoïdes et lutte biologique : paradigme ou panacée ? Vertigo - La revue en sciences de l'environnement. <http://vertigo.revues.org/4096>.
- Bokma F. (2004). Evidence against universal metabolic allometry. *Functional Ecology*, 18, 184-187.
- Bourdais D., Vernon P., Krespi L., Le Lannic J. & van Baaren J. (2006). Antennal structure of male and female *Aphidius rhopalosiphi* DeStefani-Peres (Hymenoptera: Braconidae): Description and morphological alterations after cold storage or heat exposure. *Microscopy Research and Technique*, 69, 1005-1013.
- Bowler K. (2005). Acclimation, heat shock and hardening. *Journal of Thermal Biology*, 30, 125-130.
- Bueno R. & van Cleave H.W. (1997). The effect of temperature and host density on the reproduction of *Aphelinus perpallidus* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Southwestern Entomologist*, 22, 29-37.
- Calder W.A. (1984). *Size, Function, and Life History*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Campbell A., Frazer B.D., Gilbert N., Gutierrez A.P. & Mackauer M. (1974). Temperature requirements of some aphids and their parasites. *Journal of Applied Ecology*, 11, 431-438.
- Carey J.R. (1993). *Applied Demography for Biologists with Special Emphasis on Insects*. Oxford University Press, Oxford.
- Charnov E.L., Losdenhartogh R.L., Jones W.T. & van denasse J. (1981). Sex ratio evolution in a variable environment. *Nature*, 289, 27-33.
- Chen C.P. & Walker V.K. (1994). Cold-shock and chilling tolerance in *Drosophila*. *Journal of Insect Physiology*, 40, 661-669.

- Chen N.L., Leopold R.A. & Boetel M.A. (2008a). Cold Storage of Adult *Gonatocerus ashmeadi* (Hymenoptera: Mymaridae) and Effects on Maternal and Progeny Fitness. *Journal of Economic Entomology*, 101, 1760-1770.
- Chen W.L., Leopold R.A. & Harris M.O. (2008b). Cold storage effects on maternal and progeny quality of *Gonatocerus ashmeadi* Girault (Hymenoptera: Mymaridae). *Biological Control*, 46, 122-132.
- Chi H. (1988). Life-table analysis incorporating both sexes and variable development rates among individuals. *Environmental Entomology*, 17, 26-34.
- Chown S.L. & Gaston K.J. (1999). Exploring links between physiology and ecology at macro-scales: the role of respiratory metabolism in insects. *Biological Reviews*, 74, 87-120.
- Clarke A. (1993). Seasonal acclimatization and latitudinal compensation in metabolism: do they exist? *Functional Ecology*, 7, 139-149.
- Cock M.J.W., van Lenteren J.C., Brodeur J., Barratt B.I.P., Bigler F., Bolckmans K., Consoli F.L., Haas F., Mason P.G. & Parra J.R.P. (2010). Do new Access and Benefit Sharing procedures under the Convention on Biological Diversity threaten the future of biological control? *Biocontrol*, 55, 199-218.
- Colinet H. (2007). Une approche écologique et biochimique de la résistance au froid chez un parasitoïde de puceron *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Aphidiinae). Université Catholique de Louvain, Louvain La Neuve, p. 170.
- Colinet H. & Hance T. (2009). Male reproductive potential of *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Aphidiinae) exposed to constant or fluctuating thermal regimens. *Environmental Entomology*, 38, 242-249.
- Colinet H. & Hance T. (2010). Interspecific variation in the response to low temperature storage in different aphid parasitoids. *Annals of Applied Biology*, 156, 147-156.
- Colinet H., Hance T. & Vernon P. (2006a). Water relations, fat reserves, survival, and longevity of a cold-exposed parasitic wasp *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Aphidiinae). *Environmental Entomology*, 35, 228-236.
- Colinet H., Renault D., Hance T. & Vernon P. (2006b). The impact of fluctuating thermal regimes on the survival of a cold exposed parasitic wasp, *Aphidius colemani*. *Physiological Entomology*, 31, 234-240.
- Colinet H., Nguyen T.T., Cloutier C., Michaud D. & Hance T. (2007a). Proteomic profiling of a parasitic wasp exposed to constant and fluctuating cold exposure. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37, 1177-1188.

- Colinet H., Vernon P. & Hance T. (2007b). Does thermal-related plasticity in size and fat reserves influence supercooling abilities and cold-tolerance in *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Aphidiinae) mummies? *Journal of Thermal Biology*, 32, 374-382.
- Couillien D. & Grégoire J.C. (1994). Take-off capacity as a criterion for quality-control in mass-produced predators, *Rhizophagus grandis* (Col, Rhizophagidae) for the biocontrol of bark beetles, *Dendroctonus micans* (Col, Scolytidae). *Entomophaga*, 39, 385-395.
- Coulson S.J. & Bale J.S. (1990). Characterization and limitations of the rapid cold-hardening response in the housefly *Musca domestica* (Diptera, Muscidae). *Journal of Insect Physiology*, 36, 207-211.
- Crnokrak P. & Roff D.A. (2002). Trade-offs to flight capability in *Gryllus firmus*: the influence of whole-organism respiration rate on fitness. *Journal of Evolutionary Biology*, 15, 388-398.
- Cushman J.H., Lawton J.H. & Manly B.F.J. (1993). Latitudinal patterns in european ant assemblages - variation in species richness and body-size. *Oecologia*, 95, 30-37.
- Danks H.V. (1983). Extreme individuals in natural populations. *Bulletin of the Entomological Society of America*, 29, 41 – 46.
- Danks H.V. (1991). Winter habitats and ecological adaptations for winter survival. In: *Insects at low temperature* (eds. Lee Jr RE & Denlinger DL). Chapman and Hall New York, pp. 231–259.
- Danks H.V. (1994). Diversity and integration of life-cycle control in insects. In: *Insect life-cycle polymorphism* (ed. Danks HV). Kluwer, Dordrecht, pp. 5-40.
- Danks H.V. (2006). Insect adaptations to cold and changing environments. *Canadian Entomologist*, 138, 1-23.
- De Bach P. (1943). The effect of low storage temperature on reproduction in certain parasitic Hymenoptera. *Pan-Pacific Entomologist*, 19, 112-119.
- De Clercq P. & Degheele D. (1993). Cold storage of the predatory bugs *Podisus maculiventris* (Say) and *Podisus sagitta* (Fabricius) (Heteroptera: Pentatomidae). *Parasitica*, 49, 27-41.
- Dedryver C.A., Le Ralec A. & Fabre F. (2010). The conflicting relationships between aphids and men: A review of aphid damage and control strategies. *Comptes Rendus Biologies*, 333, 539-553.

- Denlinger D.L. & Yocum G.D. (1998). Physiology of heat sensitivity in insects. In: *Temperature sensitivity in insects and application in integrated pest management* (eds. Hallman GJ & Denlinger DL). Westview Press. Boulder, pp. 7-57.
- Denis, D., Pierre, J.S., van Baaren, J. & van Alphen, J.J.M. How sudden temperature increase events and habitat quality affect parasitoids lifetime reproductive success. *Ecological modelling* Submitted.
- Dixon A.F.G. (1987). Cereal aphids as an applied problem. *Agricultural Zoological Reviews*, 2, 1-57.
- Doyon J. & Boivin G. (2005). The effect of development time on the fitness of female *Trichogramma evanescens*. *Journal of Insect Science*, 5:4.
- Eijs I.E.M., Ellers J. & van Duinen G.J. (1998). Feeding strategies in drosophilid parasitoids: the impact of natural food resources on energy reserves in females. *Ecological Entomology*, 23, 133-138.
- Eilenberg J., Hajek A. & Lomer C. (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *Biocontrol*, 46, 387-400.
- Ellers J. (1996). Fat and eggs: An alternative method to measure the trade-off between survival and reproduction in insect parasitoids. *Netherlands Journal of Zoology*, 46, 227-235.
- Ellers J., van Alphen J.J.M. & Sevenster J.G. (1998). A field study of size-fitness relationships in the parasitoid *Asobara tabida*. *Journal of Animal Ecology*, 67, 318-324.
- Ellers J. & vanAlphen J.J.M. (1997). Life history evolution in *Asobara tabida*: plasticity in allocation of fat reserves to survival and reproduction. *Journal of Evolutionary Biology*, 10, 771-785.
- Ernsting G. & Isaaks J.A. (2002). Gamete production and sexual size dimorphism in an insect (*Orchesella cincta*) with indeterminate growth. *Ecological Entomology*, 27, 145-151.
- Frandon J. & Kabiri F. (1999). La lutte biologique contre la Pyrale du maïs avec les trichogrammes. *Les dossiers de l'environnement de l'INRA*, 19, 107-112.
- Ganteaume A., Tabone E. & Poinsothalaguer N. (1995). Variation in biotic potentialities of *Encarsia formosa* after black pupae cold storage .2. variation in daily fecundity and longevity. *Journal of Applied Entomology-Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie*, 119, 547-551.

- Garcia P.V., Pereira N. & Oliveira L.M. (2009). Side-effects of organic and synthetic pesticides on cold-stored diapausing prepupae of *Trichogramma cordubensis*. *Biocontrol*, 54, 451-458.
- Garcia P.V., Wajnberg E., Pizzol J. & Oliveira M.L.M. (2002). Diapause in the egg parasitoid *Trichogramma cordubensis*: role of temperature. *Journal of Insect Physiology*, 48, 349-355
- Gerin C., Hance T. & van Impe G. (1994). Demographic parameters of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). *Journal of Applied Entomology-Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie*, 118, 370-377.
- Gillooly J.F., Brown J.H., West G.B., Savage V.M. & Charnov E.L. (2001). Effects of size and temperature on metabolic rate. *Science*, 293, 2248-2251.
- Giron D. & Casas J. (2003). Lipogenesis in an adult parasitic wasp. *Journal of Insect Physiology*, 49, 141-147.
- Glazier D.S. (2005). Beyond the '3/4-power law': variation in the intra- and interspecific scaling of metabolic rate in animals. *Biological Reviews*, 80, 611-662.
- Godfray H.C.J. (1994). *Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology*. Princeton University Press, Princeton.
- Grant B., Burton S., Contoreggi C. & Rothstein M. (1980). Outbreeding via frequency-dependent mate selection in the parasitoid wasp, *Nasonia* (= *Mormoniella*) *vitripennis* walker. *Evolution*, 34, 983-992.
- Gray E.M. & Bradley T.J. (2003). Metabolic rate in female *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae): Age, size, activity, and feeding effects. *Journal of Medical Entomology*, 40, 903-911.
- Greathead D.J. (1995). Benefits and risks of classical biological control. In: *Biological control: benefits and risks* (eds. Hokkanen HMT & Lynch JM). Cambridge University Press Cambridge, pp. 53-63.
- Hagvar E.B. & Hofsvang T. (1991). Aphid parasitoids (Hymenoptera, Aphidiidae): biology, host selection and use in biological control. *Biocontrol News Inf.*, 12, 13-41.
- Hamalainen M. & Markkula M. (1977). Cool storage of *Coccinella septempunctata* and *Adalia bipunctata* (Col, Coccinellidae) eggs for use in biological control in greenhouses. *Annales Agriculturae Fenniae*, 16, 132-136.
- Hammill E., Wilson R.S. & Johnston I.A. (2004). Sustained swimming performance and muscle structure are altered by thermal acclimation in male mosquitofish. *Journal of Thermal Biology*, 29, 251-257.

- Hance T. (2001). Insectes: partenaires efficaces contre ravageurs gourmands. Un nouveau défi en agriculture. *Probio-Reveu*.
- Hance T., Nibelle D., Lebrun P., van Impe G. & van hove C. (1994). Selection of *Azolla* forms resistant to the water lily aphid, *Rhopalosiphum nymphaeae* - Susceptibility of *Azolla* forms to *Rhopalosiphum nymphaeae*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 70, 19-25.
- Hance T., van Baaren J., Vernon P. & Boivin G. (2007). Impact of extreme temperatures on parasitoids in a climate change perspective. *Annual Review of Entomology*, 52, 107-126.
- Hanna A.D. (1935). Fertility and toleration of low temperature in *Euchalcidia caryobory* Hanna (Hymenoptera: chalcidinae). *Bulletin of Entomological Research*, 26, 315-322.
- Hartel D.L. (1994). *Génétique des populations*. Flammarion, Paris.
- He X.Z., Teulon D.A.J. & Wang Q. (2006). Oviposition strategy of *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Aphidiidae) in response to host density. *New Zealand Plant Protection*, 59, 190–194.
- He X.Z., Wang Q. & Teulon D.A.J. (2004). Emergence, sexual maturation and oviposition of *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Aphidiidae). *New Zealand Plant Protection*, 57, 214-220.
- Hoddle M.S., van Driesche R.G. & Sanderson J.P. (1998). Biology and use of the whitefly parasitoid *Encarsia formosa*. *Annual Review of Entomology*, 43, 645-669.
- Hoffmann A.A. & Harshman L.G. (1999). Desiccation and starvation resistance in *Drosophila*: patterns of variation at the species, population and intrapopulation levels. *Heredity*, 83, 637-643.
- Hoffmann A.A. & Parsons P.A. (1989). Selection for increased desiccation resistance in *drosophila melanogaster*: additive genetic control and correlated responses for other stresses. *Genetics*, 122, 837-845.
- Hofsvang T. & Hagvar E.B. (1977). Cold storage tolerance and super cooling points of momies of *Ephedrus ceasicola* stray and *Aphidius colemani* (Hym: Aphelinidae). *Norwegian Journal of Entomology*, 24, 1-6.
- Huey R.B. & Kingsolver J.G. (1989). Evolution of thermal sensitivity of ectotherm performance. *Trends in Ecology & Evolution*, 4, 131-135.
- Hutchinson L.A. & Bale J.S. (1994). Effects of sublethal cold stress on the aphid *Rhopalosiphum padi*. *Journal of Applied Ecology*, 31, 102-108.

- Ismail M., Vernon P., Hance T. & van Baaren J. (2010). Physiological costs of cold exposure on the parasitoid *Aphidius ervi*, without selection pressure and under constant or fluctuating temperatures. *BioControl*, 55, 729–740.
- Jalali S.K. & Singh S.P. (1992) Differential response of four *Trichogramma* species to low temperatures for short term storage. *Entomophaga*, 37, 159–165.
- Jerraya A. & AL Rouechdi K. (2005). La protection phytosanitaire en Afrique du Nord: quelles perspectives ? In: *Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement, Pesticides et biopesticides- OGM* (ed. Regnault-Roger C). Lavoisier Paris, pp. 475-493.
- Jervis M.A., Ellers J. & Harvey J.A. (2008). Resource acquisition, allocation, and utilization in parasitoid reproductive strategies. *Annual Review of Entomology*, 53, 361-385.
- Kalule T. & Wright D.J. (2005). Effect of cultivars with varying levels of resistance to aphids on development time, sex ratio, size and longevity of the parasitoid *Aphidius colemani*. *Biocontrol*, 50, 235-246.
- Kennedy J.S. & Hance T. (1995). Varietal screening based on demographic parameters: Resistance of tea to *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). *Environmental Entomology*, 24, 1481-1486.
- Kim Y. & Song W.R. (2000). Effect of thermoperiod and photoperiod on cold tolerance of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology*, 29, 868-873.
- King C.B.R. (1943). Cold storage effect on *Trichogramma* and on eggs of *Ephestia kuehniella*. *Tea Quarterly*, 1, 19-27.
- Kislow J. & Edwards L.J. (1972). Repellent odour in aphids. *Nature*, 235, 108-109.
- Kostal V., Havelka J. & Simek P. (2001). Low temperature storage and cold hardiness in two populations of the predatory midge *Aphidoletes aphidimyza*, differing in diapause intensity. *Physiological Entomology*, 26, 320-328.
- Kostal V., Tamura M., Tollarova M. & Zahradnickova H. (2004). Enzymatic capacity for accumulation of polyol cryoprotectants changes during diapause development in the adult red firebug, *Pyrrhocoris apterus*. *Physiological Entomology*, 29, 344-355.
- Kostal V., Renault D., Mehrabianova A. & Bastl J. (2007). Insect cold tolerance and repair of chill injury at fluctuating thermal regimes: Role of ion homeostasis. *Comparative Biochemistry and Physiology a Molecular & Integrative Physiology*, 147, 231-238.

- Lactin D.J., Holliday N.J., Johnson D.L. & Craigen R. (1995). Improved rate model of temperature-dependent development by arthropods. *Environmental Entomology*, 24, 68-75.
- Landis D.A., Wratten S.D. & Gurr G.M. (2000). Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture. *Annual Review of Entomology*, 45, 175-201.
- Langer A. & Hance T. (2000). Overwintering strategies and cold hardiness of two aphid parasitoid species (Hymenoptera : Braconidae : Aphidiinae). *Journal of Insect Physiology*, 46, 671-676.
- Larentzaki E., Powell G. & Copland M.J.W. (2007). Effect of cold storage on survival, reproduction and development of adults and eggs of *Franklinothrips vespiformis* (Crawford). *Biological Control*, 43, 265-270.
- LaSalle J. (1993). Hymenoptera and biodiversity. In: *Hymenoptera and biodiversity* (eds. LaSalle J & Gauld ID). CAB International Wallingford, pp. 197-215.
- Latham D.R. & Mills N.J. (2010). Life history characteristics of *Aphidius transcaspicus*, a parasitoid of mealy aphids (*Hyalopterus* species). *Biological Control*, 54, 147-152.
- Lavy D., Nedved O. & Verhoef H.A. (1997). Effects of starvation on body composition and cold tolerance in the collembolan *Orchesella cincta* and the isopod *Porcellio scaber*. *Journal of Insect Physiology*, 43, 973-978.
- Le Lann C. (2009). Partage de la ressource au sein d'une guildes : des histoires de vie, comportements et réactions à la température contrastés. Thèse de doctorat, Université de Rennes 1.
- Le Ralec A. (1991). Les hyménoptères parasitoïdes : Adaptations de l'appareil reproducteur femelle. Morphologie et ultrastructure de l'ovaire, de l'œuf et de l'ovipositeur. Thèse de doctorat, Université de Rennes 1.
- Lee R.E. & Costanzo J.P. (1998). Biological ice nucleation and ice distribution in cold-hardy ectothermic animals. *Annual Review of Physiology*, 60, 55-72.
- Lehmann F.O., Dickinson M.H. & Staunton J. (2000). The scaling of carbon dioxide release and respiratory water loss in flying fruit flies (*Drosophila* spp.). *Journal of Experimental Biology*, 203, 1613-1624.
- Leopold R.A. (1998). Cold storage of insects for integrated pest management. In: *Temperature sensitivity in insects and application in integrated pest management* (eds. Hallman GJ & Denlinger DL). West view Press, Boulder, pp. 235-267.

- Leopold R.A., Rojas R.R. & Atkinson P.W. (1998). Post pupariation cold storage of three species of flies: Increasing chilling tolerance by acclimation and recurrent recovery periods. *Cryobiology*, 36, 213-224.
- Levie A. (2002). Development of a biological control method of wheat aphids, by using Aphidiinae parasitoids (Hymenoptera: Braconidae). Université catholique de Louvain, Louvain-La-Neuve, p. 168.
- Levie A., Dogot P. & Hance T. (2000). Release of *Aphidius rhopalosiphi* (Hymenoptera: Aphidiinae) for cereal aphid control: field cage experiments. *European Journal of Entomology*, 97, 527-531.
- Levie A., Legrand M.A., Dogot P., Pels C., Baret P.V. & Hance T. (2005a). Mass releases of *Aphidius rhopalosiphi* (Hymenoptera: Aphidiinae), and strip management to control of wheat aphids. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 105, 17-21.
- Levie A., Vernon P. & Hance T. (2005b). Consequences of acclimation on survival and reproductive capacities of cold-stored mummies of *Aphidius rhopalosiphi* (Hymenoptera: Aphidiinae). *Journal of Economic Entomology*, 98, 704-708.
- Lin L.A. & Ives A.R. (2003). The effect of parasitoid host-size preference on host population growth rates: an example of *Aphidius colemani* and *Aphis glycines*. *Ecological Entomology*, 28, 542-550.
- Lopez S.N. & Botto E. (2005). Effect of cold storage on some biological parameters of *Eretmocerus corni* and *Encarsia formosa* (Hymenoptera : Aphelinidae). *Biological Control*, 33, 123-130.
- Luczynski A., Nyrop J.P. & Shi A. (2007). Influence of cold storage on pupal development and mortality during storage and on post-storage performance of *Encarsia formosa* and *Eretmocerus eremicus* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Biological Control*, 40, 107-117.
- Lysyk T.J. (2004). Effects of cold storage on development and survival of three species of parasitoids (Hymenoptera: Pteromalidae) of house fly, *Musca domestica* L. *Environmental Entomology*, 33, 823-831.
- Ma C.S. & Chen Y.W. (2006). Effects of constant temperature, exposure period, and age on diapause induction in *Trichogramma dendrolimi*. *Biological Control*, 36, 267-273.
- Mondor E.B., Baird D.S., Slessor K.N. & Roitberg B.D. (2000). Ontogeny of alarm pheromone secretion in pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Chemical Ecology*, 26, 2875-2882.

- Montgomery M.E. & Nault L.R. (1977). Comparative response of aphids to alarm pheromone, (E)-Beta- Farnesene. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 22, 236-242.
- Muratori F., Lannic J.L., Nenon J.P. & Hance T. (2004). Larval morphology and development of *Aphidius rhopalosiphi* (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Canadian Entomologist*, 136, 169-180.
- Murdoch W.W. & Briggs C.J. (1996). Theory for biological control: Recent developments. *Ecology*, 77, 2001-2013.
- Nedved O., Lavy D. & Verhoef H.A. (1998). Modelling the time-temperature relationship in cold injury and effect of high temperature interruptions on survival in a chill-sensitive collembolan. *Functional Ecology*, 12, 816-824.
- Nespolo R.F., Lardies M.A. & Bozinovic F. (2003). Intrapopulational variation in the standard metabolic rate of insects: repeatability, thermal dependence and sensitivity (Q10) of oxygen consumption in a cricket. *Journal of Experimental Biology*, 206, 4309-4315.
- Niven J.E. & Scharlemann J.P.W. (2005). Do insect metabolic rates at rest and during flight scale with body mass? *Biology Letters*, 1, 346-349.
- O'Donnell D.J. (1987). Larval development and the determination of the number of instars in aphid parasitoids (Hymenoptera: Aphidiidae). *International Journal of Insect Morphology & Embryology*, 16, 3-15.
- Olson D.M., Fadamiro H., Lundgren J.G. & Heimpel G.E. (2000). Effects of sugar feeding on carbohydrate and lipid metabolism in a parasitoid wasp. *Physiological Entomology*, 25, 17-26.
- Omer A.D., Johnson M.W. & Tabashnik B.E. (1996). Demography of the leafminer parasitoid *Ganaspidium utilis* Beardsley (Hymenoptera: Eucolidae) at different temperatures. *Biological Control*, 6, 29-34.
- Osman M.Z. & Selman B.J. (1993). Storage of *Chrysoperla carnea* steph (Neuroptera: Chrysopidae) eggs and pupae. *Journal of Applied Entomology-Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie*, 115, 420-424.
- Outreman Y. (2000). Capacité discriminatoire et exploitation des colonies d'hôtes chez un parasitoïde solitaire. Ecologie comportementale et modélisation. Thèse de doctorat, Université de Rennes1.
- Pandey R.R. & Johnson M.W. (2005). Effects of cool storage on *Anagyrus ananatis* Gahan (Hymenoptera : Encyrtidae). *Biological Control*, 35, 9-16.

- Parrella M.P. (2008). Biological control in protected culture: Will it continue to expand? *Phytoparasitica*, 36, 3-6.
- Penn S.L., Ridgway R.L., Scriven G.T. & Inscoc M.N. (1998). Quality assurance by the commercial producer of arthropod natural enemies. In: *Mass-reared Natural Enemies: Application, Regulation, and Needs* (eds. Ridgway RL, Hoffman JH, Inscoc MN & Glenister CS). Proceedings of Thomas Say Publications in Entomology Entomological Society of America Lanham, Maryland, pp. 202-230.
- Pennacchio F. & Digilio M.C. (1990). Morphology and development of larval instars of *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae). *Bolletino del Laboratorio di Entomologia Agraria Filippo Silvestri*, 46, 63–74.
- Piironen S., Lindstrom L. & Lyytinen A. (2010). Resting metabolic rate can vary with age independently from body mass changes in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of Insect Physiology*, 56, 277-282.
- Pitcher S.A., Hoffmann M.P., Gardner J., Wright M.G. & Kuhar T.P. (2002). Cold storage of *Trichogramma ostrinae* reared on *Sitotroga cerealella* eggs. *Biocontrol*, 47, 525-535.
- Pizzol J. & Pintureau B. (2008). Effect of photoperiod experienced by parents on diapause induction in *Trichogramma cacoeciae*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 127, 72-77.
- Polgar L. (1986). Effect of cold storage on the emergence, sex ratio and fecundity of *Aphidius matricariae*. In: *Ecology of Aphidophaga* (ed. Hodek I). Prague & Dr W. Junk Dordrecht. Holland, pp. 255-260.
- Pullin A.S. (1987). Adult feeding time, lipid-accumulation, and overwintering in *Aglais urticae* and *Inachis io* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Journal of Zoology*, 211, 631-641.
- Reim C., Teuschl Y. & Blanckenhorn W.U. (2006a). Size-dependent effects of larval and adult food availability on reproductive energy allocation in the Yellow Dung Fly. *Functional Ecology*, 20, 1012-1021.
- Reim C., Teuschl Y. & Blanckenhorn W.U. (2006b). Size-dependent effects of temperature and food stress on energy reserves and starvation resistance in yellow dung flies. *Evolutionary Ecology Research*, 8, 1215-1234.
- Renault D., Hance T., Vannier G. & Vernon P. (2003). Is body size an influential parameter in determining the duration of survival at low temperatures in *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae)? *Journal of Zoology*, 259, 381-388.
- Renault D., Nedved O., Hervant F. & Vernon P. (2004). The importance of fluctuating thermal regimes for repairing chill injuries in the tropical beetle *Alphitobius*

- diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) during exposure to low temperature. *Physiological Entomology*, 29, 139-145.
- Rigaux M., Vernon P. & Hance T. (2000). Relationship between acclimation of *Aphidius rhopalosiphi* (De Stefani-Peres) in autumn and its cold tolerance (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). In: *52nd International Symposium on Crop Protection, Pts I and II, Proceedings*, pp. 253-263.
- Rivero A. & West S.A. (2002). The physiological costs of being small in a parasitic wasp. *Evolutionary Ecology Research*, 4, 407-420.
- Rogowitz G.L. & Chappell M.A. (2000). Energy metabolism of Eucalyptus boring beetles at rest and during locomotion: Gender makes a difference. *Journal of Experimental Biology*, 203, 1131-1139.
- Rohne O. (2002). Effect of temperature and host stage on performance of *Aphelinus varipes* Forster (Hym., Aphelinidae) parasitizing the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Hom., Aphididae). *Journal of Applied Entomology-Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie*, 126, 572-576.
- Roitberg B.D., Boivin G. & Vet L.E.M. (2001). Fitness, parasitoids, and biological control: an opinion. *Canadian Entomologist*, 133, 429-438.
- Roux O., Le Lann C., van Alphen J.J.M. & van Baaren J. (2010). How does heat shock affect the life history traits of adults and progeny of the aphid parasitoid *Aphidius avenae* (Hymenoptera: Aphidiidae)? *Bulletin of Entomological Research*, 100, 543-549.
- Rudolf E., Malausa J.C., Millot P. & Pralavorio R. (1993). Influence of cold temperature on biological characteristics of *Orius laevigatus* and *Orius majusculus* (Het., Anthocoridae). *Entomophaga*, 38, 317-325.
- Rundle B.J., Thomson L.J. & Hoffmann A.A. (2004). Effects of cold storage on field and laboratory performance of *Trichogramma carverae* (Hymenoptera : Trichogrammatidae) and the response of three *Trichogramma* spp. (*T. carverae*, *T. nr. brassicae*, and *T. funiculatum*) to cold. *Journal of Economic Entomology*, 97, 213-221.
- Sagarra L.A., Vincent C. & Stewart R.K. (2001). Body size as an indicator of parasitoid quality in male and female *Anagyrus kamali* (Hymenoptera: Encyrtidae). *Bulletin of Entomological Research*, 91, 363-367.
- Salt R.W. (1961). Principles of insect cold-hardiness. *Annual Review of Entomology*, 6, 55-74.
- Savage V.M., Allen A.P., Brown J.H., Gillooly J.F., Herman A.B., Woodruff W.H. & West G.B. (2007). Scaling of number, size, and metabolic rate of cells with body size in

- mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 4718-4723.
- Seidl S.E. & King B. (1993). Sex-ratio manipulation by the parasitoid wasp *Muscidifurax raptor* in response to host size. *Evolution*, 47, 1876-1882.
- Sequeira R. & Mackauer M. (1992). Covariance of adult size and development time in the parasitoid wasp *Aphidius ervi* in relation to the size of its host, *Acyrtosiphon pisum*. *Evolutionary Ecology*, 6, 34-44.
- Shalaby F.F. & Rabasse J.M. (1979). Effect of conservation of the aphid parasitoid *Aphidius matricariae* Hal. (Hymenoptera: Aphidiidae) on adult longevity, mortality and emergence. *Annals of Agricultural Science*, 11, 58-71.
- Shirota Y., Carter N., Rabbinge R. & Ankersmit G.W. (1983). Biology of *Aphidius rhopalosiphi*, a parasitoid of cereal aphids. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 34, 27-34.
- Sibly R. & Calow P. (1987). Ecological compensation: a complication for testing life history theory. *Journal of Theoretical Biology*, 125, 177-186.
- Sigsgaard L. (2000). The temperature-dependent duration of development and parasitism of three cereal aphid parasitoids, *Aphidius ervi*, *A. rhopalosiphi*, and *Praon volucre*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 95, 173-184.
- Sigsgaard L. (2005). Biological control of arthropod pests in outdoor crops – the new challenge. In: *Proceedings of the International Workshop "Implementation of Biocontrol in Practice in Temperate Regions – Present and Near Future"* Research Centre Flakkebjerg, Denmark. DIAS Report No. 119 (2006), 153-167.
- Starý P. (1970a). *Biology of aphid parasites (Hymenoptera: Aphidiidae) with respect to integrated control*. Series Entomologicae. Dr.W. Junk Publishers. The Hague.
- Starý P. (1970b). Storage of *Aphidius smithi* (Hym., Aphidiidae) for mass release. *Bollettino del Laboratorio di Entomologia Agraria Filippo Silvestri*, 28, 224-228.
- Starý P. (1973). A review of the *Aphidius* species (Hymenoptera, Aphidiidae) of Europe. *Annotations Zoologicae et Botanicae*, 84, 1-85.
- Starý P. (1987). Aphid parasitoids in an urban environment (Hymenoptera: Aphidiidae). *Acta Entomologica Bohemoslovaca*, 84, 91-101.
- Stilmant D. (1994). Differential impact of three *Sitobion avenae* parasitoids. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences*, 16, 89-99.
- Stilmant D., van Bellinghen C., Hance T. & Boivin G. (2008). Host specialization in habitat specialists and generalists. *Oecologia*, 156, 905-912.

- Stireman J.O., O'Hara J.E. & Wood D.M. (2006). Tachinidae: Evolution, behavior, and ecology. *Annual Review of Entomology*, 51, 525-555.
- Stireman J.O. & Singer M.S. (2003). What determines host range in parasitoids? An analysis of a tachinid parasitoid community. *Oecologia*, 135, 629-638.
- Tauber M.J., Tauber C.A. & Gardescu S. (1993). Prolonged storage of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environmental Entomology*, 22, 843-848.
- Tauber M.J., Tauber C.A. & Masaki S. (1986). *Seasonal adaptations of insects*. Oxford University Press, New York.
- Terblanche J.S. & Chown S.L. (2007). The effects of temperature, body mass and feeding on metabolic rate in the tsetse fly *Glossina morsitans centralis*. *Physiological Entomology*, 32, 175-180.
- Terblanche J.S., Klok C.J. & Chown S.L. (2004). Metabolic rate variation in *Glossina pallidipes* (Diptera: Glossinidae): gender, ageing and repeatability. *Journal of Insect Physiology*, 50, 419-428.
- Turnock W.J. & Bodnaryk R.P. (1991). Latent cold injury and its conditional expression in the bertha armyworm, *Mamestra configurata* (Noctuidae, Lepidoptera). *Cryo-Letters*, 12, 377-384.
- Uçkan F. & Gülel A. (2001). The effect of cold storage on the adult longevity, fecundity and sex ratio of *Apanteles galleriae* (Hym.: Braconidae). *Turkish Journal of Zoology*, 25, 187-191.
- van Impe G. & Hance T. (1993). Une technique d'évaluation de la sensibilité variétale au tétranyque tisserand, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). Application au haricot, au concombre, à la tomate et au fraisier. *Agronomie*, 13, 739- 749.
- van Lenteren J.C. (2003a). Commercial availability of biological control agents. In: *Quality Control and Production of Biological Control Agents: Theory and Testing Procedures* (ed. van Lenteren JC). CABI Publishing Wallingford, UK, pp. 167-179.
- van Lenteren J.C. (2003b). Need for Quality Control of Mass-produced Biological Control Agents. In: *Quality Control and Production of Biological Control Agents: Theory and Testing Procedures* (ed. van Lenteren JC). CABI Publishing Wallingford, UK, pp. 1-18.
- van Lenteren J.C. (2006). The area under biological control and IPM in greenhouses is much larger than we thought. *Sting*, 29: 7.

- van Lenteren J.C., Roskam M.M. & Timmer R. (1997). Commercial mass production and pricing of organisms for biological control of pests in Europe. *Biological Control*, 10, 143-149.
- van Lenteren J.C. & Tommasini M.G. (2003). Mass production, storage, shipment and release of natural enemies. In: *Quality Control and Production of Biological Control Agents: Theory and Testing Procedures* (ed. van Lenteren J.C.). CABI Publishing Wallingford, UK, pp. 181-189.
- van Lenteren J.C. & Woets J. (1988). Biological and integrated pest control in greenhouses. *Annual Review of Entomology*, 33, 239-269.
- Visser B. & Ellers J. (2008). Lack of lipogenesis in parasitoids: A review of physiological mechanisms and evolutionary implications. *Journal of Insect Physiology*, 54, 1315-1322.
- Visser B., Le Lann C., den Blanken F.J., Harvey J.A., van Alphen J.J.M. & Ellers J. (2010). Loss of lipid synthesis as an evolutionary consequence of a parasitic lifestyle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 8677-8682.
- Visser M.E. (1994). The importance of being large - the relationship between size and fitness in females of the parasitoid *Aphaereta minuta* (Hymenoptera, Braconidae). *Journal of Animal Ecology*, 63, 963-978.
- Wajnberg E. (1991). Quality control of mass-reared arthropods: A genetical and statistical approach. In: *Proceedings of the 5th Workshop on Quality Control of mass-reared arthropods* (ed. Bigler F). Wageningen (NL), pp. 15-25.
- Wajnberg E. (2004). Measuring genetic variation in natural enemies used for biological control: Why and How? In: *Genetics, evolution and biological control* (eds. Ehler L.E., Sforza R & Mateille T). CABI Publishing, pp. 19-37.
- Wajnberg E. & Ris N. (2009). Parasitism and biological control. In: *Ecology & Evolution of Parasitism* (eds. Thomas F, Guégan J.F. & Renaud F). Oxford University Press Oxford, pp. 107-127.
- Walgama R.S. & Zalucki M.P. (2006). Evaluation of different models to describe egg and pupal development of *Xyleborus fornicatus* Eichh. (Coleoptera: Scolytidae), the shot-hole borer of tea in Sri Lanka. *Insect Science*, 13, 109-118
- Wellings P.W., Ward S.A., Dixon A.F.G. & Rabbinge R. (1989). Crop loss assessment. In: *Aphids, their biology, natural enemies and control* (eds. Minks A.K. & Harrewijn P). 2C, Elsevier NL, pp. 49-69.

- West S.A., Flanagan K.E. & Godfray H.C.J. (1996). The relationship between parasitoid size and fitness in the field, a study of *Achrysocharoides zwoelferi* (Hymenoptera: Eulophidae). *Journal of Animal Ecology*, 65, 631-639.
- Whitaker-Deerberg R.L., Michels G.J., Wendel L.E. & Farooqui M. (1994). The effect of short-term cold storage on emergence of *Aphelinus asychis* Walker (Hymenoptera: Aphelinidae) mummies. *Southwestern Entomologist*, 19, 115-118.
- Yadav A., He X.Z. & Wang Q. (2008). Effect of photoperiod on development and reproduction in Tasmanian lacewing *Micromus tasmaniae* (Walker) (Neuroptera: Hemerobiidae). *New Zealand Plant Protection*, 61, 338-342.
- Yang T.C. & Chi H. (2006). Life tables and development of *Bemisia argentifolii* (Homoptera : Aleyrodidae) at different temperatures. *Journal of Economic Entomology*, 99, 691-698.
- Zaldivar-Riveron A., Mori M. & Quicke D.L.J. (2006). Systematics of the cyclostome subfamilies of braconid parasitic wasps (Hymenoptera : Ichneumonoidea): A simultaneous molecular and morphological Bayesian approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38, 130-145.
- Ziegler R. (1997). Lipid synthesis by ovaries and fat body of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *European Journal of Entomology*, 94, 385-391.
- Ziegler R. & Ibrahim M.M. (2001). Formation of lipid reserves in fat body and eggs of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*, 47, 623-627.