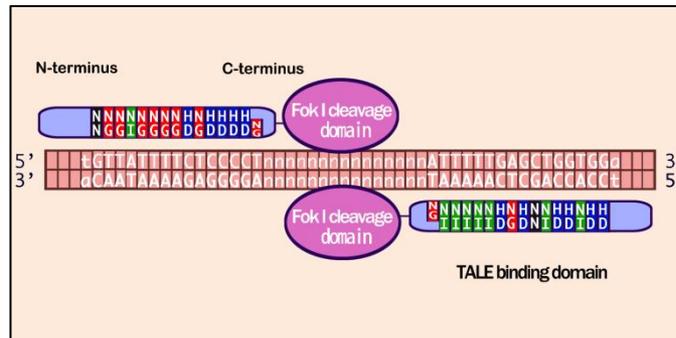


Mutagenèse aléatoire et mutagenèse dirigée chez le puceron



Mutagenèse aléatoire: L'EMS

Génétique Directe - Forward genetics

1. Sélectionner un **processus biologique/phénotype**
2. Générer un **population de mutants** au **hasard** et à grand échelle
3. **Screening**: observer la population de mutants pour observer un phénotype associé au processus
4. **Mapping** et **clonage** de la mutation

Génétique Directe - Forward genetics

1. Sélectionner un **processus biologique/phénotype**
2. Générer un **population de mutants** au **hasard** et à grand échelle
- 3. Screening**: observer la population de mutants pour observer un phénotype associé au processus
4. **Mapping** et **clonage** de la mutation

Screening sur la réponse photopériodique

Génétique Directe - Forward genetics

1. Sélectionner un **processus biologique/phénotype**
2. Générer un **population de mutants** au **hasard** et à grand échelle
3. **Screening**: observer la population de mutants pour observer un phénotype associé au processus
4. **Mapping** et **clonage** de la mutation

Screening sur la réponse photopériodique

Génétique Indirecte - Reverse Genetics

1. Sélectionner un **gène d'intérêt**
2. Générer un **collections de mutants**
3. Les mutations sont localisées dans la collection de mutants (PCR-based screen)
4. **Sélection des mutants** pour le/les gènes d'intérêt dans la collection

Approche TILING (projet)

Comment générer des mutations aléatoires?

Agent Physique

Physical agents
(Fast neutrons,
X-rays and
accelerated ions)

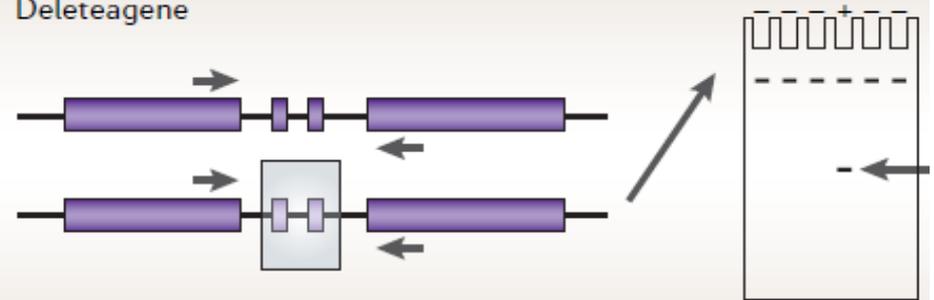
Big insertions, deletions
and rearrangements

Mostly loss-of-function mutants

Medium efficiency

Laborious identification
of the mutations

Deleteagene



Comment générer des mutations aléatoires?

Agent Physique

Physical agents (Fast neutrons, X-rays and accelerated ions)	Big insertions, deletions and rearrangements	Deleteagene
	Mostly loss-of-function mutants	
	Medium efficiency	
	Laborious identification of the mutations	

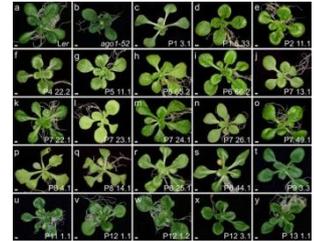
Agent Chimique

Mutagen	Main characteristics	Use in reverse genetic approaches
Chemical agents (for example, EMS)	Point mutations Large range of mutations including loss and gain of function Very high efficiency with hundreds of mutations per genome Difficult to find the mutation in the genome	TILLING

Mutagenèse EMS

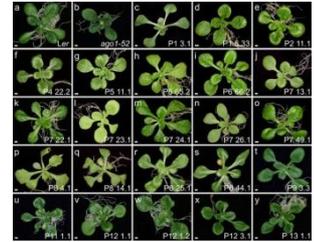
Mutagenèse EMS pour Génétique Directe

EMS induit des mutations ponctuelles (GC->AT) de façon aléatoire dans tout le génome
Technique efficace chez **plusieurs espèces** : *Drosophila*, *Arabidopsis*, *C.Elegans*...



Mutagenèse EMS pour Génétique Directe

EMS induit des mutations ponctuelles (GC->AT) de façon aléatoire dans tout le génome
Technique efficace chez **plusieurs espèces** : *Drosophila*, *Arabidopsis*, *C.Elegans*...

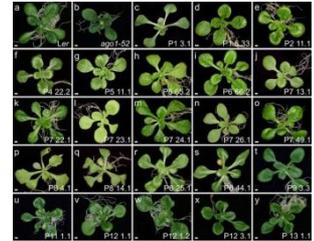


Principe: alimentation d'individus sur **milieu artificiel** contenant de l'**EMS** puis mise en **collection** des descendants (lignées « mutantes »)



Mutagenèse EMS pour Génétique Directe

EMS induit des mutations ponctuelles (GC->AT) de façon aléatoire dans tout le génome
Technique efficace chez **plusieurs espèces** : *Drosophila*, *Arabidopsis*, *C.Elegans*...



Principe: alimentation d'individus sur **milieu artificiel** contenant de l'**EMS** puis mise en **collection** des descendants (lignées « mutantes »)

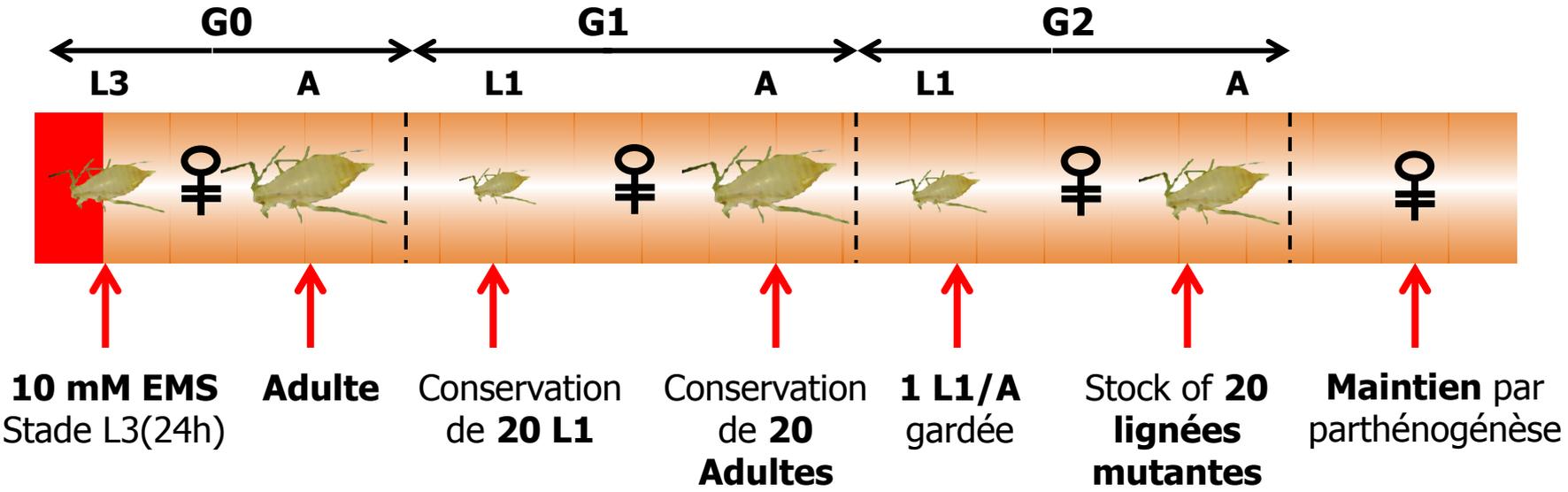


Mise au point de l'expérience

- Démonstration de **l'efficacité du traitement EMS** par l'estimation de la proportion de mâles dans la descendance des individus traités
- **Concentration** optimale en EMS: 10 mM
- **Clone**-dépendant (P212 utilisé ici)
- Etablissement d'un **protocole** pour **générer** et **maintenir** en collection des lignées mutantes et les cribler pour un phénotype donné

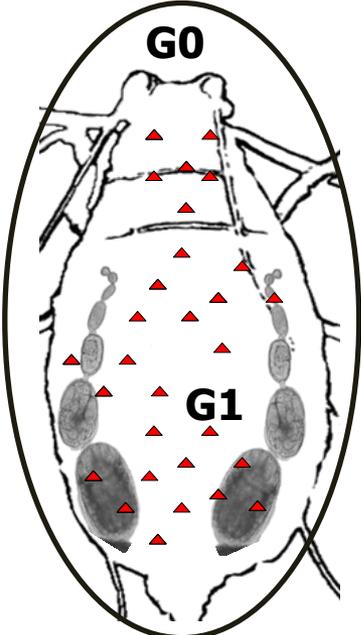
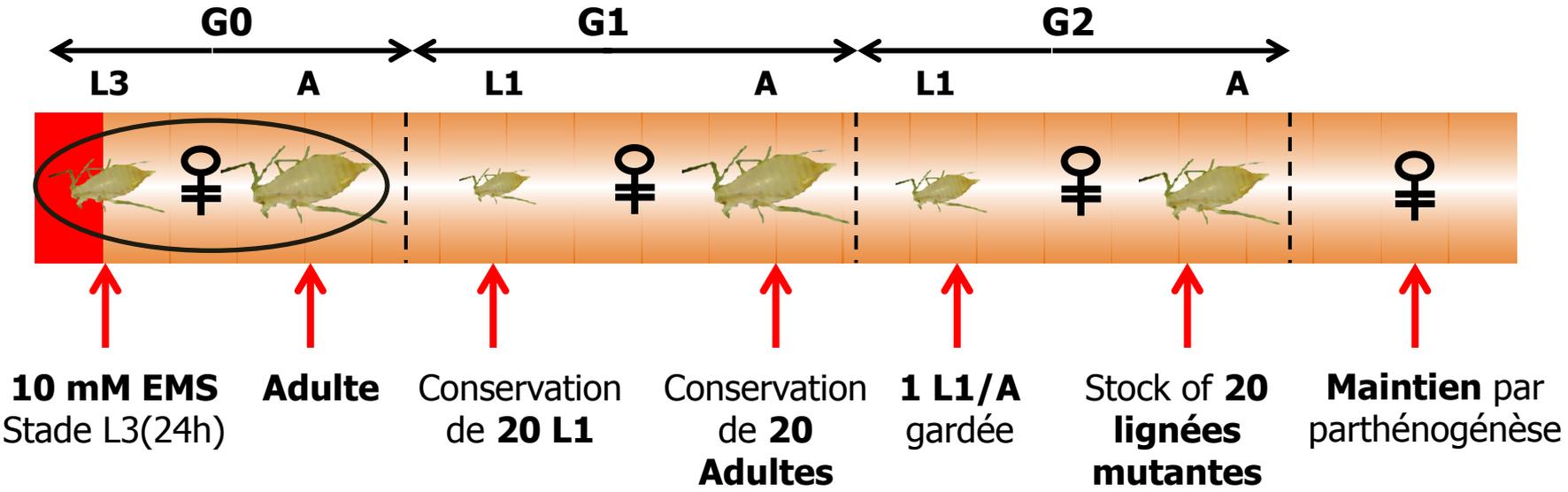
Mutagenèse EMS pour Génétique Directe

➤ **Protocole** permettant de générer des collections de **lignées** « mutants »



Mutagenèse EMS pour Génétique Directe

➤ **Protocole** permettant de générer des collections de **lignées « mutants »**

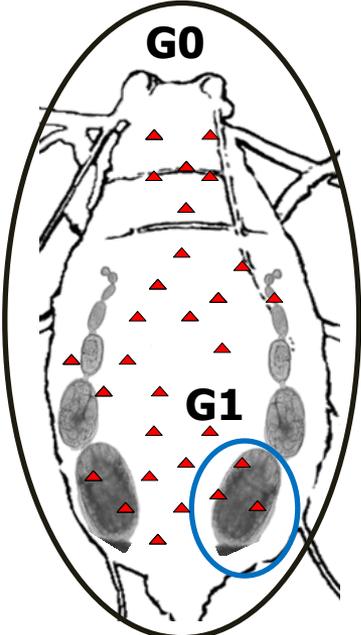
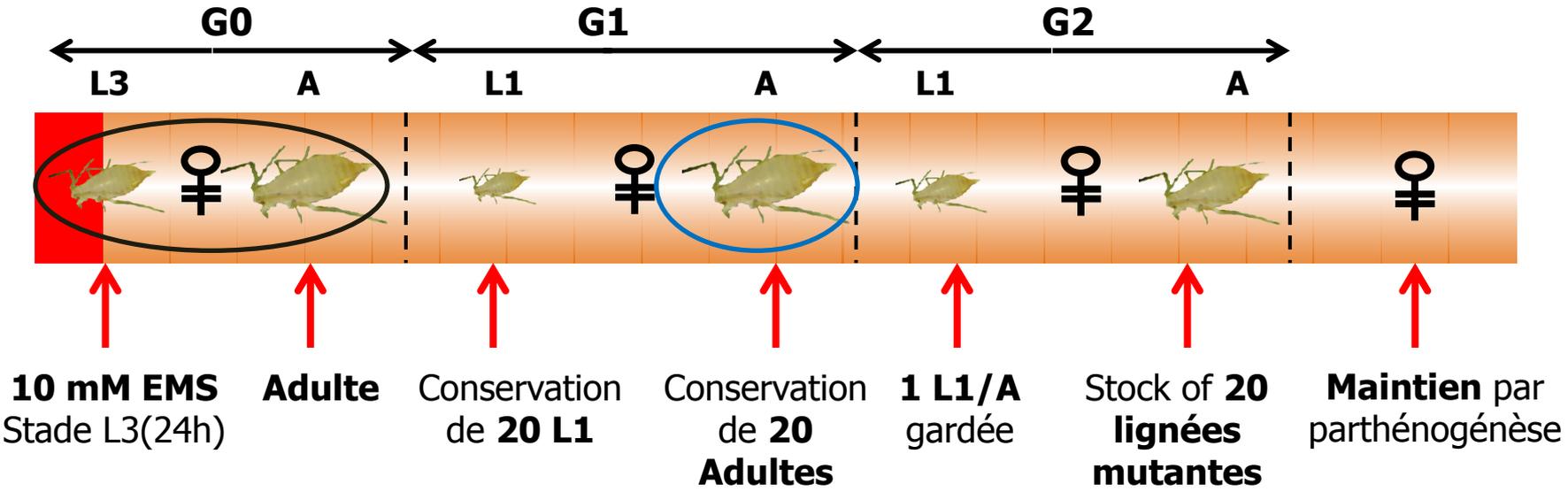


L'EMS doit cibler:

- La **G0**: les pucerons qui se sont alimentés sur le milieu avec EMS

Mutagenèse EMS pour Génétique Directe

➤ **Protocole** permettant de générer des collections de **lignées « mutants »**

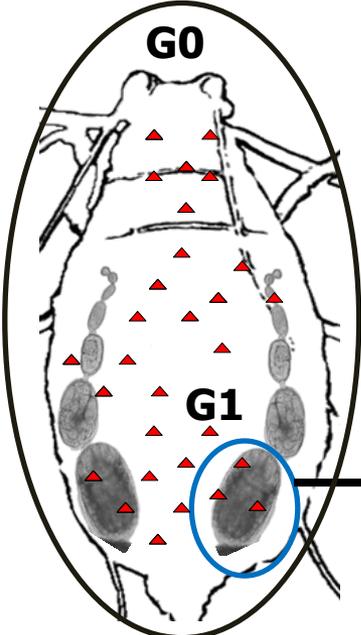
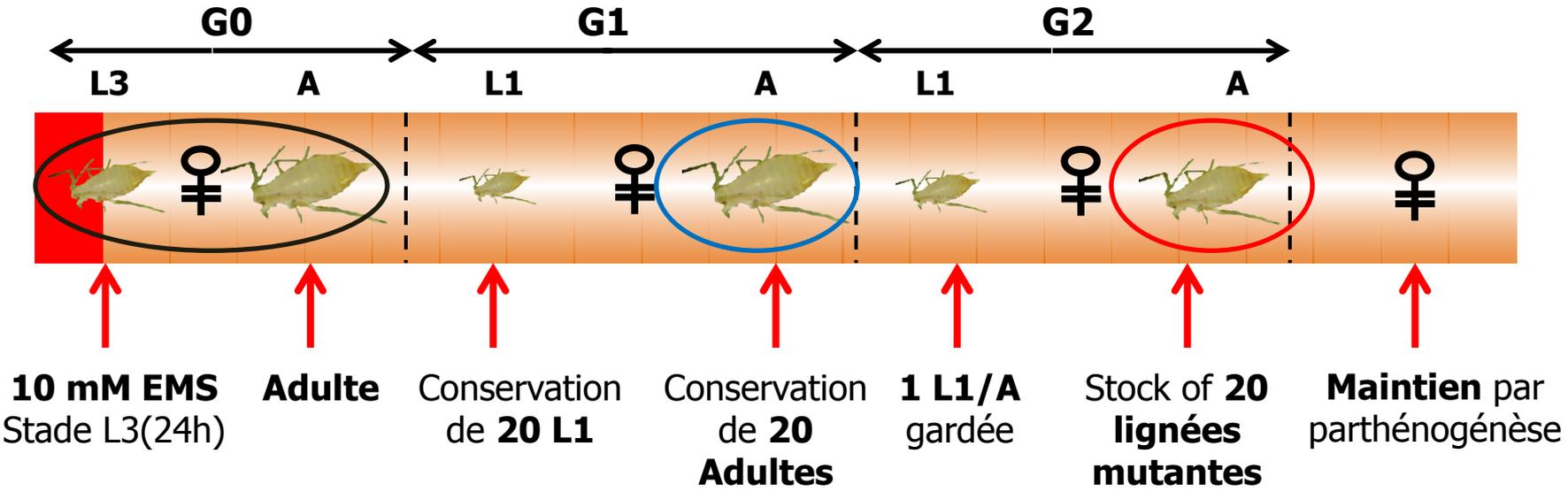


L'EMS doit cibler:

- La **G0**: les pucerons qui se sont alimentés sur le milieu avec EMS
- Les **embryons de la G0**: la **future G1**

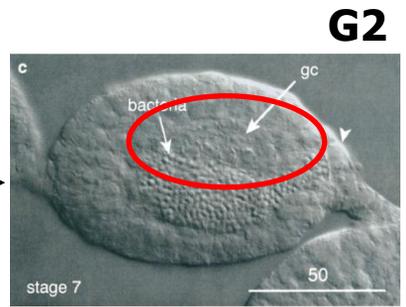
Mutagenèse EMS pour Génétique Directe

➤ **Protocole** permettant de générer des collections de **lignées « mutants »**



L'EMS doit cibler:

- La **G0**: les pucerons qui se sont alimentés sur le milieu avec EMS
- Les **embryons de la G0**: la **future G1**
- La **lignée germinale** de ces embryons (stade ovocyte une cellule): la **future G2**

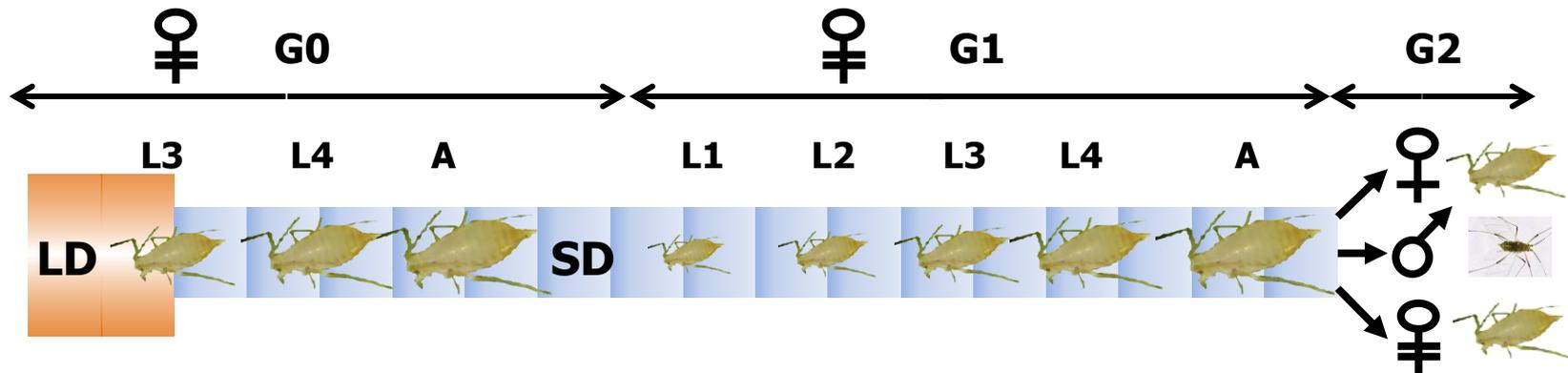


Mutagenèse EMS pour Génétique Directe



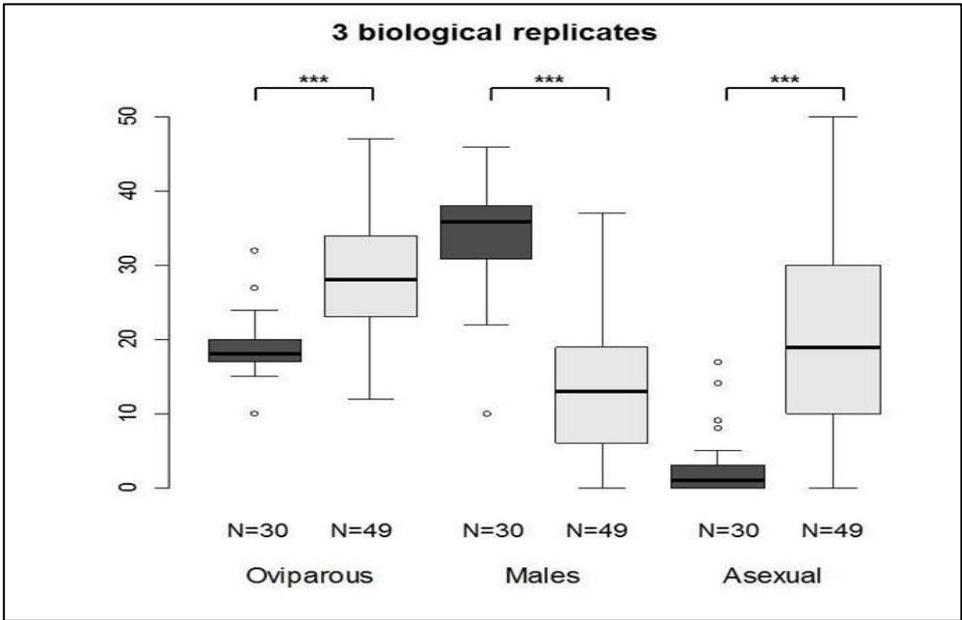
➤ Analyse phénotypique des lignées mutantes

Phénotype étudié: réponse à la photopériode



- ✓ Transfert de **jours longs** (16h) à **jours courts** (12h): production d'individus **sexués** (Femelle ovipare – 25% / Mâles – 50%) et de **femelles asexuées** (25%)
- ✓ **Une dizaine** de « lignées mutantes » testées pour leur réponse photopériodique
- ✓ **Une lignée** montre une **réponse photopériodique différente** du type sauvage: confirmation par 3 réplicats biologiques indépendants

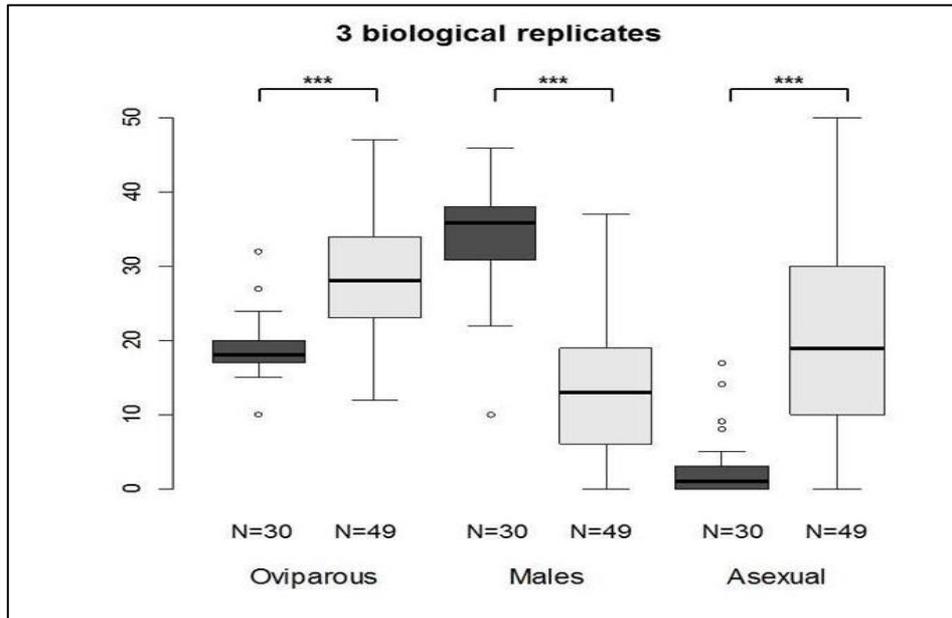
Mutagenèse EMS pour Génétique Directe



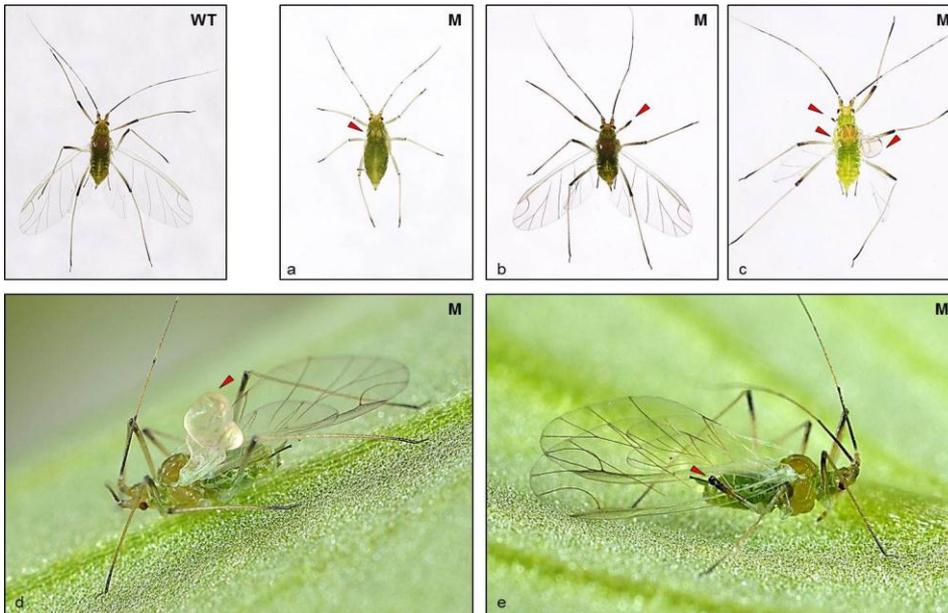
Wild type
Mutant

✓ **Proportion de mâles** produits dans la descendance très **réduite** et **reproductible**

Mutagenèse EMS pour Génétique Directe



✓ **Proportion de mâles** produits dans la descendance très **réduite** et **reproductible**



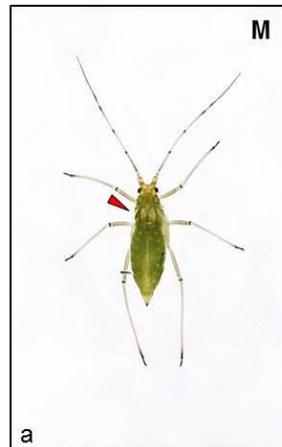
✓ **Dans la descendance** des individus mutants, présence de plusieurs **mâles** avec **défauts morphologiques**

Mutagenèse EMS pour Génétique Directe

- ✓ Création d'une **lignée mutante** présentant un défaut de production de mâles en réponse à la diminution de la photopériode: **létaleté embryonnaire?**

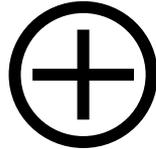


- **Mutagenèse EMS** efficace pour produire des mutants
- Possibilité de **créer** et **maintenir** en collection des lignées mutantes

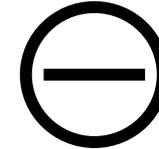


Mutagenèse EMS pour Génétique Directe

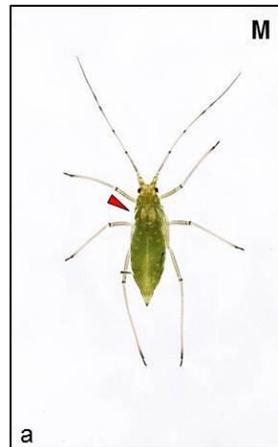
- ✓ Création d'une **lignée mutante** présentant un défaut de production de mâles en réponse à la diminution de la photopériode: **léthalité embryonnaire?**



- **Mutagenèse EMS** efficace pour produire des mutants
- Possibilité de **créer** et **maintenir** en collection des lignées mutantes



- **Système biologique complexe** et nombre **limité** de lignées pouvant être maintenues en collection
- **Protocole à simplifier**: sur 2 générations au lieu de 3 (placer des L1 sur milieu artificiel avec EMS)
- **Phénotype testé** difficile à étudier: travail sur un **phénotype plus simple** (réponse à la phéromone d'alarme)



Mutagenèse EMS pour Génétique Indirecte - PROJET

Objectif: générer au hasard des **collections de mutants** et **screener par PCR** la présence de mutations sur plusieurs gènes d'intérêt

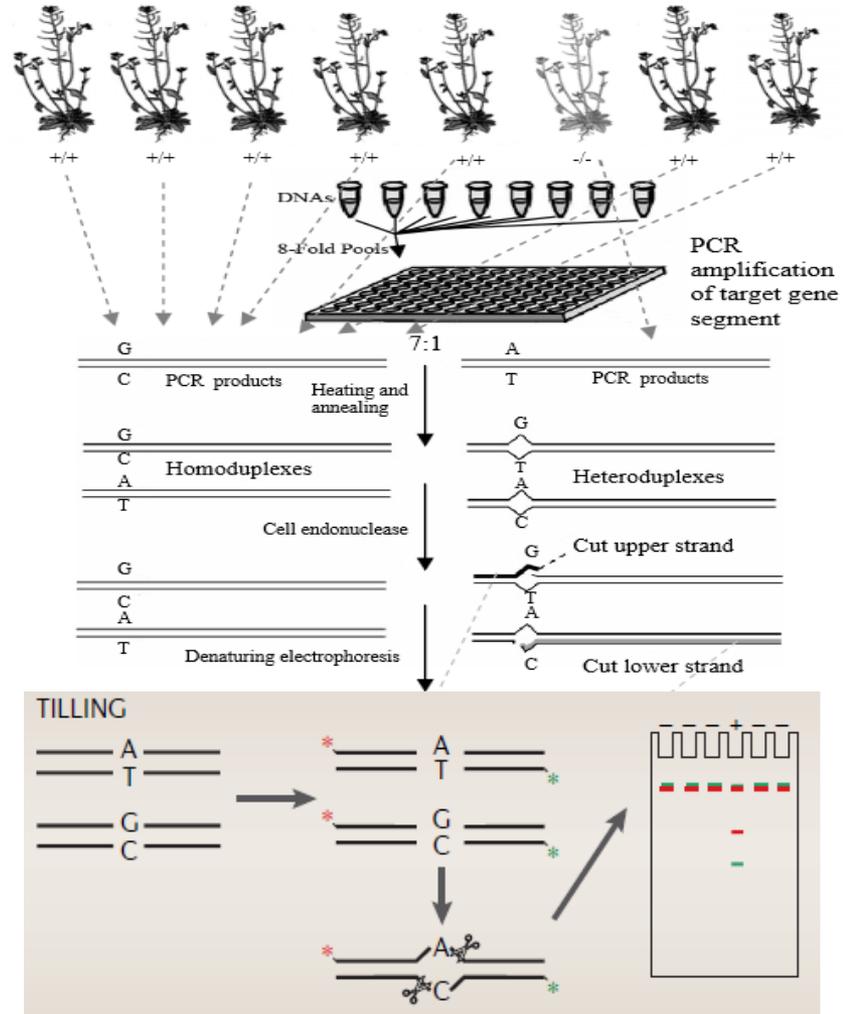
Approche inspirée de la méthode dite de **TILLING:**
Targeted Induced Local
Lesions In Genomes,
initialement développée chez
Arabidopsis



Mutagenèse EMS pour Génétique Indirecte - PROJET

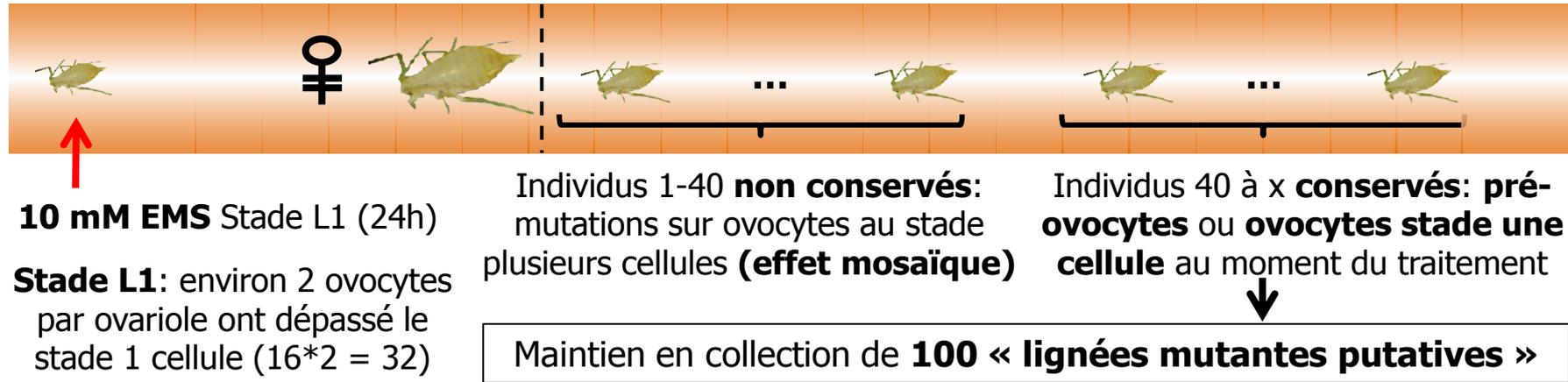
Objectif: générer au hasard des **collections de mutants** et **screener par PCR** la présence de mutations sur plusieurs gènes d'intérêt

Approche inspirée de la méthode dite de **TILLING**: Targeted Induced Local Lesions In Genomes, initialement développée chez *Arabidopsis*



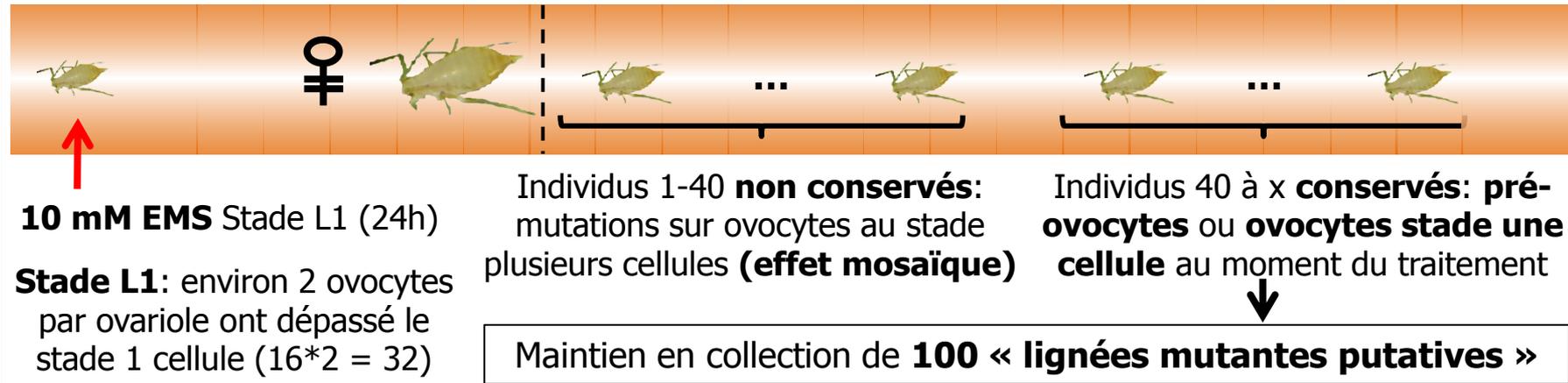
Mutagenèse EMS pour Génétique Indirecte - PROJET

1. Générer des collections de mutants



Mutagenèse EMS pour Génétique Indirecte - PROJET

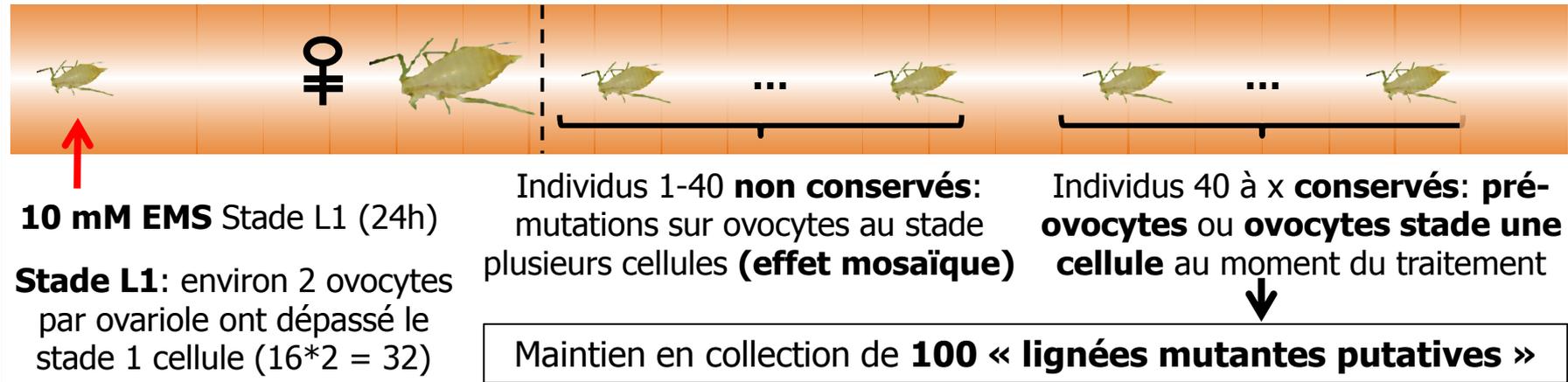
1. Générer des collections de mutants



- **Clone P212** capable de produire une descendance importante malgré le traitement EMS au stade L1 (fécondité moyenne: **80 descendants**)

Mutagenèse EMS pour Génétique Indirecte - PROJET

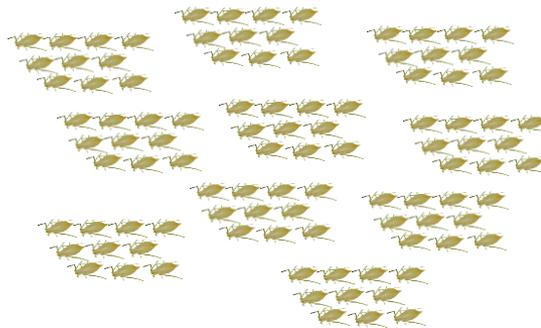
1. Générer des collections de mutants



- **Clone P212** capable de produire une descendance importante malgré le traitement EMS au stade L1 (fécondité moyenne: **80 descendants**)

2. Extraction d'ADN de pools de « lignées mutantes putatives »

Extraction d'ADN en pool de **10** individus (1 individu adulte par lignée)



10 pools d'ADN de 10 lignées pour la détection de mutations par PCR

3. Identification des mutations par PCR

- **Screening par PCR** la présence ou non de mutations pour les gènes candidats dans les **pools** de lignées mutantes
 - Approche de type **PCR/séquençage**
 - Définition **d'amorces** sur les **exons** de chaque gène candidat
 - PCR sur un **pool de 10 WT** vs un pool de **10 « lignées mutantes putatives »**
 - Séquençage, alignement et comparaison
 - Choix des gènes candidats: nombre (nombre d'exons), taille des gènes

3. Identification des mutations par PCR

- **Screening par PCR** la présence ou non de mutations pour les gènes candidats dans les **pools** de lignées mutantes
 - Approche de type **PCR/séquençage**
 - Définition **d'amorces** sur les **exons** de chaque gène candidat
 - PCR sur un **pool de 10 WT** vs un pool de **10 « lignées mutantes putatives »**
 - Séquençage, alignement et comparaison
 - Choix des gènes candidats: nombre (nombre d'exons), taille des gènes
- Si on observe une mutation pour un des gènes candidats dans le pool, on refait la PCR sur les 10 lignées individuelles qui constituent le pool pour identifier **la lignée mutante**
- Générer une lignée **homozygote** pour la mutation par auto-croisement
- Si on observe **pas de mutation**, on génère une **nouvelle collection** de 100 mutants

3. Identification des mutations par PCR

- **Screening par PCR** la présence ou non de mutations pour les gènes candidats dans les **pools** de lignées mutantes
 - Approche de type **PCR/séquençage**
 - Définition **d'amorces** sur les **exons** de chaque gène candidat
 - PCR sur un **pool de 10 WT** vs un pool de **10 « lignées mutantes putatives »**
 - Séquençage, alignement et comparaison
 - Choix des gènes candidats: nombre (nombre d'exons), taille des gènes
- Si on observe une mutation pour un des gènes candidats dans le pool, on refait la PCR sur les 10 lignées individuelles qui constituent le pool pour identifier **la lignée mutante**
- Générer une lignée **homozygote** pour la mutation par auto-croisement
- Si on observe **pas de mutation**, on génère une **nouvelle collection** de 100 mutants



Screening « **rapide** »

Possibilité de tester **plusieurs gènes**
candidats



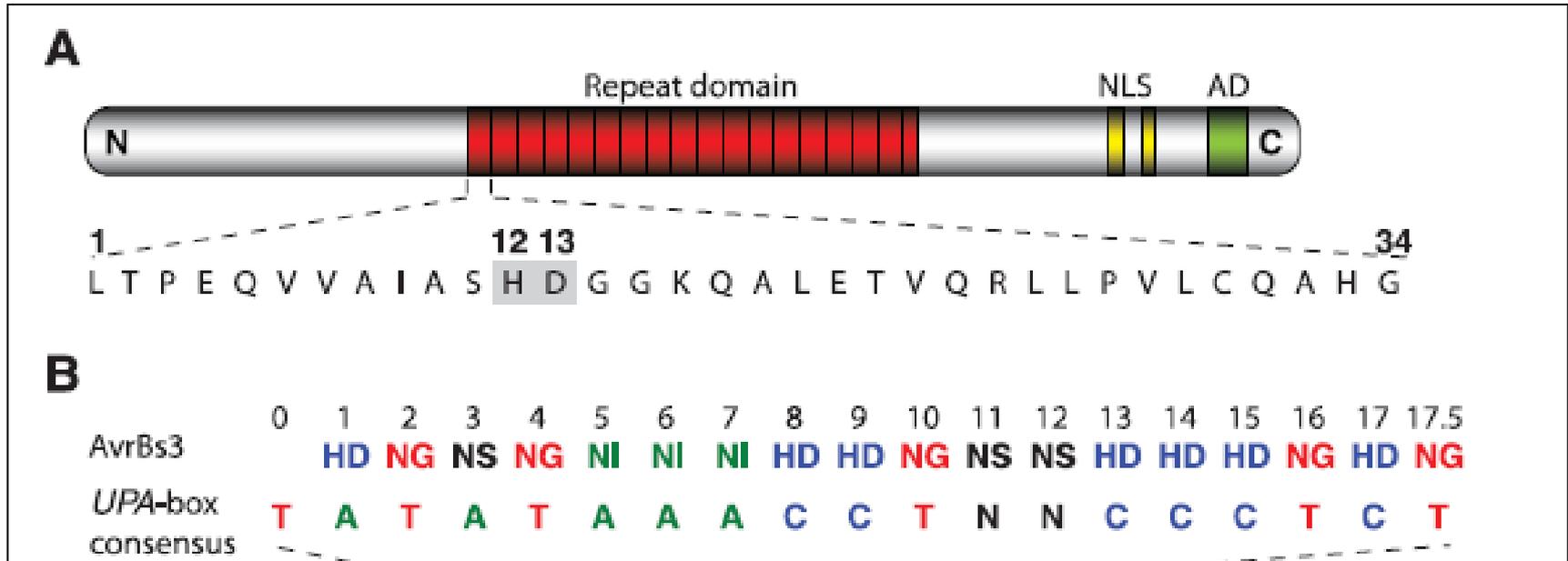
Plusieurs mutations: **nettoyer** le fond
génétique

Nombre limité de **lignées maintenues**:
limites du modèle puceron

Mutagenèse dirigée: Le TALEN

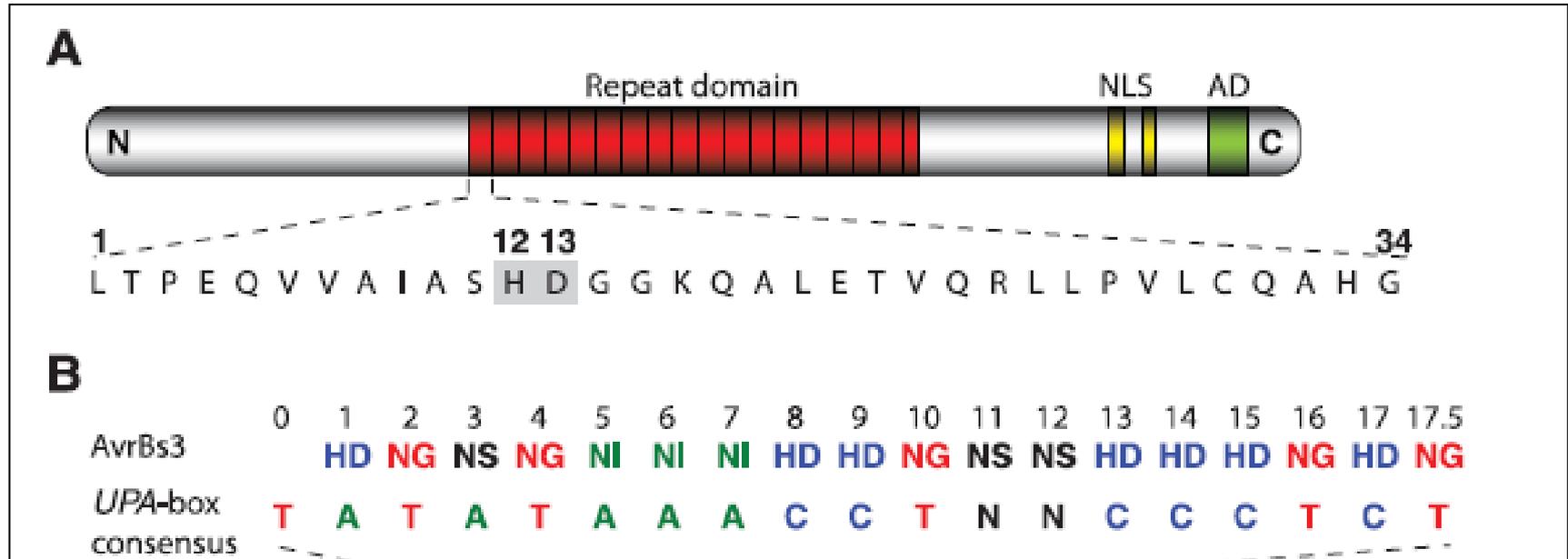
Mutagenèse dirigée: Principe du TALEN

- **TALEs proteins:** code de reconnaissance de l'ADN (découvertes chez *Xanthomonas*)
- Protéine composée de **domaines répétés de 33-35 AA** qui reconnaissent chacun 1 nucléotide



Mutagenèse dirigée: Principe du TALEN

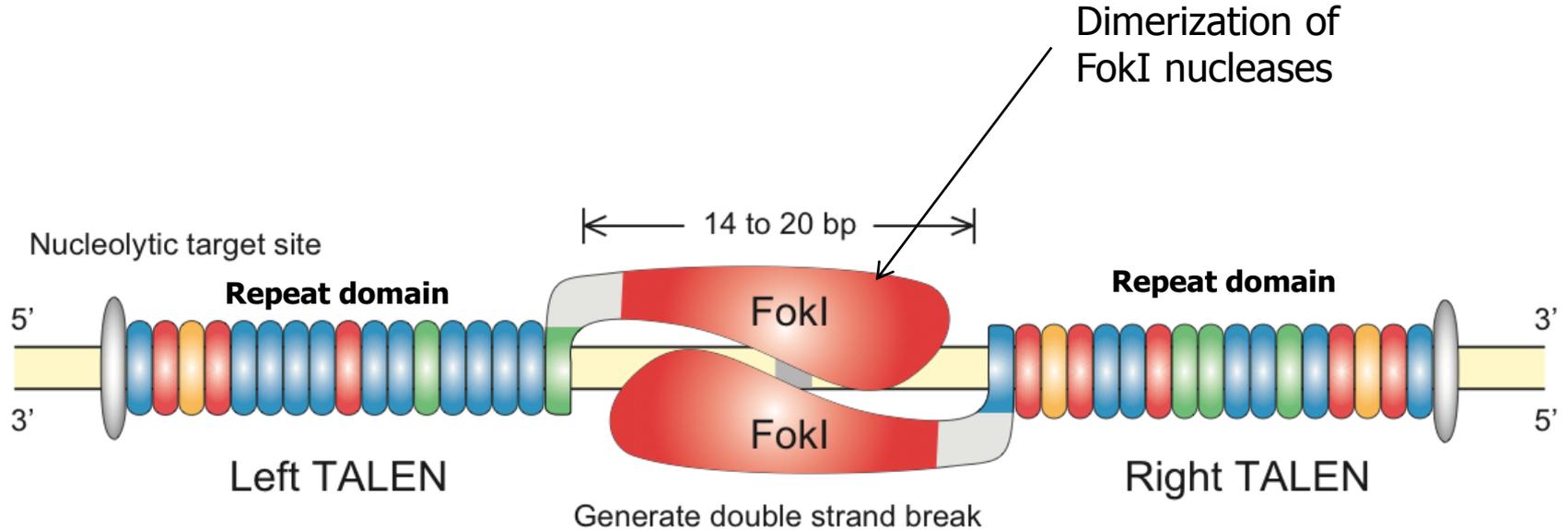
- **TALEs proteins:** code de reconnaissance de l'ADN (découvertes chez *Xanthomonas*)
- Protéine composée de **domaines répétés de 33-35 AA** qui reconnaissent chacun 1 nucléotide



- Spécificité de reconnaissance des nucléotides dépend de 2 **résidus «hypervariables»**
- Suivant la **combinaison de répétitions**, possibilité de **cibler** une région **précise** et **unique** du génome

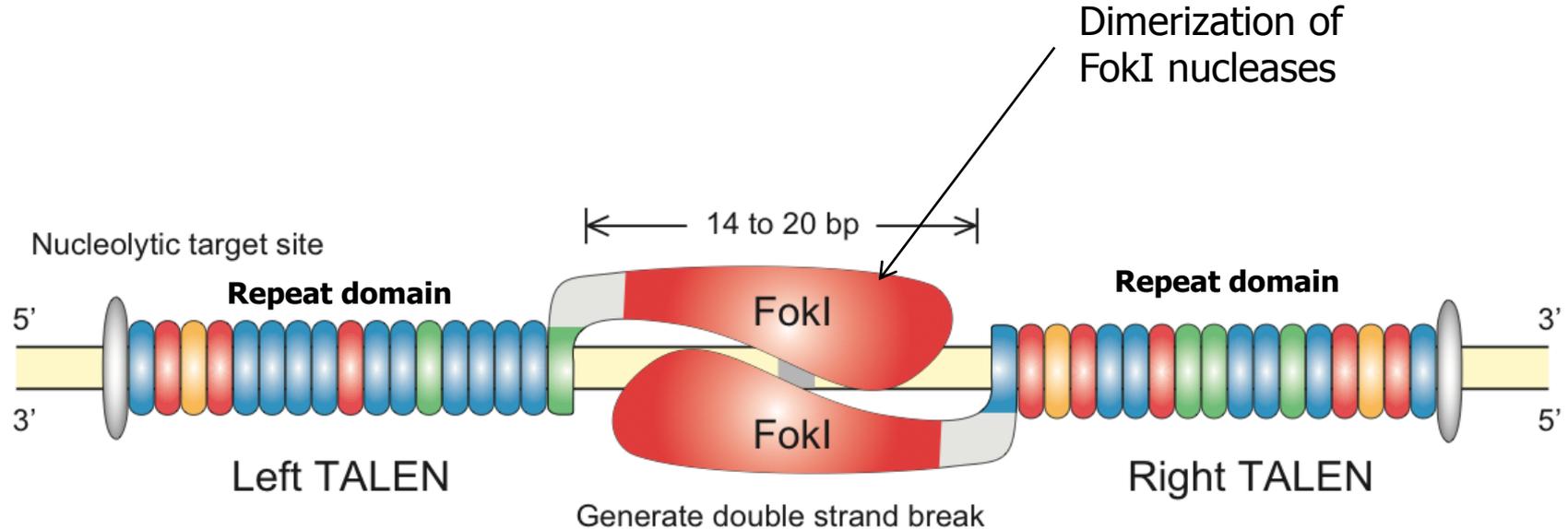
Mutagenèse dirigée: Principe du TALEN

- **Domaines répétés** (Left TALEN et Right TALEN) fusionnés avec des **nucléases** (voire activateurs de transcription ou recombinaisons)



Mutagenèse dirigée: Principe du TALEN

- **Domaines répétés** (Left TALEN et Right TALEN) fusionnés avec des **nucléases** (voire activateurs de transcription ou recombinaisons)



- Les **domaines enzymatiques FokI** vont générer des **coupures double-brin de l'ADN**
- Cette coupure va être réparée avec **erreurs: Non Homologous End-Joining (NHEJ)**

Application du TALEN au modèle puceron

Stratégie

1. **Sélectionner** un **gène d'intérêt**
2. Création des Left et Right TALEN qui vont cibler les séquences du gène qui encadrent la portion codante à muter
3. **Clonage** des séquences (Domaines répétés + Séquence FokI)
4. **Transcription** *in-vitro* des Left et Right TALEN
5. Injection combinée des 2 ARNm

Application du TALEN au modèle puceron

Stratégie

1. **Sélectionner** un **gène d'intérêt**
2. Création des Left et Right TALEN qui vont cibler les séquences du gène qui encadrent la portion codante à muter
3. **Clonage** des séquences (Domaines répétés + Séquence FokI)
4. **Transcription** *in-vitro* des Left et Right TALEN
5. Injection combinée des 2 ARNm

Quel gène?

REPORTS

Lateral Transfer of Genes from Fungi Underlies Carotenoid Production in Aphids

Nancy A. Moran^{1*} and Tyler Jarvik²

Le gène **Tor**, responsable de la couleur Rose (Carotenoid desaturase)



Pucerons **Roses**

Tor +/+

Tor +/-



Pucerons **Verts**

Tor -/-

Dans les populations naturelles, large **délétion** du Locus Tor chez les **lignées vertes**

Application du TALEN au modèle puceron

Stratégie

1. **Sélectionner** un **gène d'intérêt**
2. Création des Left et Right TALEN qui vont cibler les séquences du gène qui encadrent la portion codante à muter
3. **Clonage** des séquences (Domaines répétés + Séquence FokI)
4. **Transcription** *in-vitro* des Left et Right TALEN
5. Injection combinée des 2 ARNm

Quel gène?

REPORTS

Lateral Transfer of Genes from Fungi Underlies Carotenoid Production in Aphids

Nancy A. Moran^{1*} and Tyler Jarvik²

Le gène **Tor**, responsable de la couleur Rose (Carotenoid desaturase)



Pucerons **Roses**

Tor $+/+$

Tor $+/-$



Pucerons **Verts**

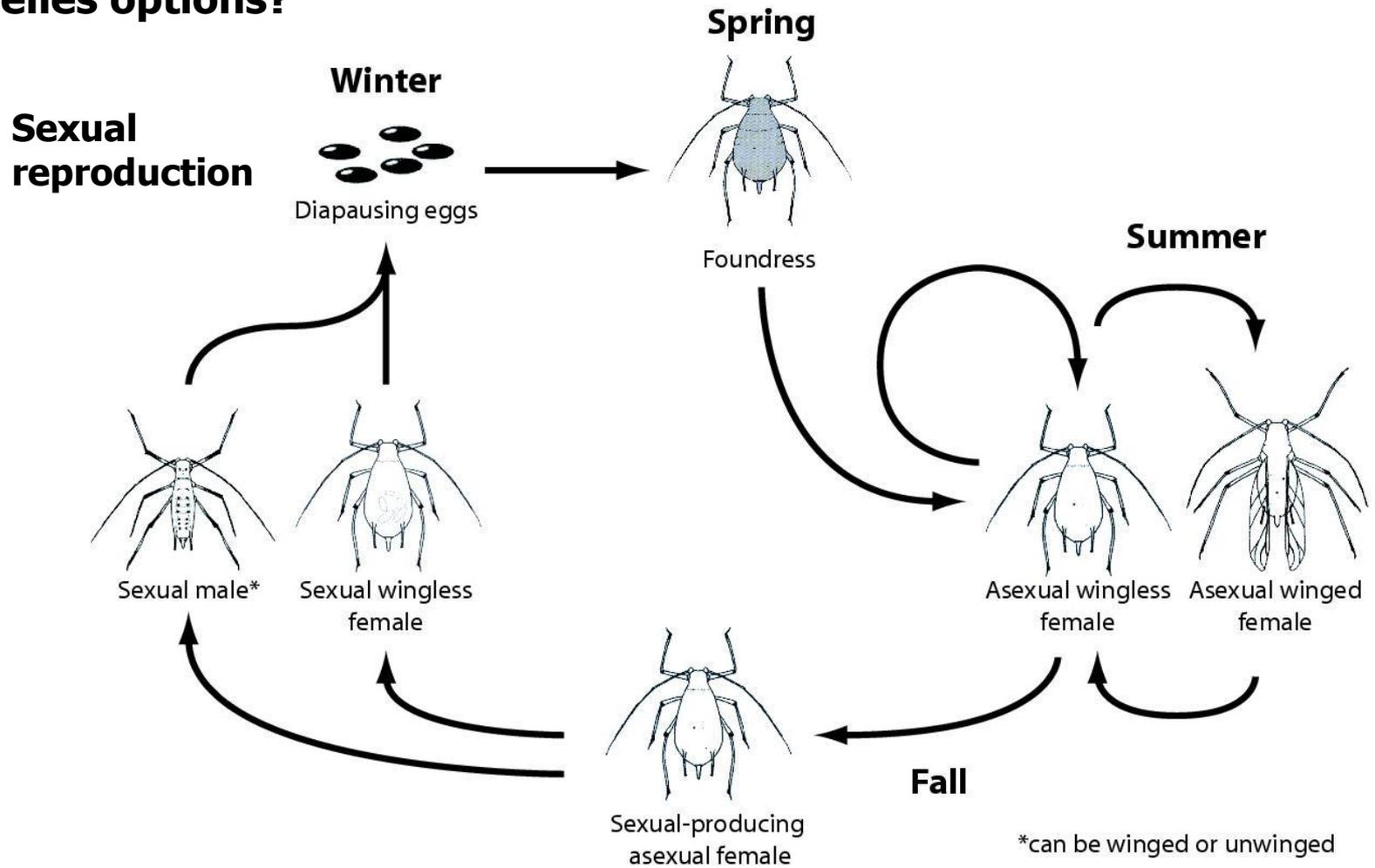
Tor $-/-$

Dans les populations naturelles, large **délétion** du Locus Tor chez les **lignées vertes**

Croiser des lignées **homozygotes Rose** (Tor $+/+$) et **Verts** (Tor $-/-$) et cibler l'allèle « Rose » chez les descendants homozygotes **Roses** (Tor $+/-$) en **injectant** les 2 TALENs

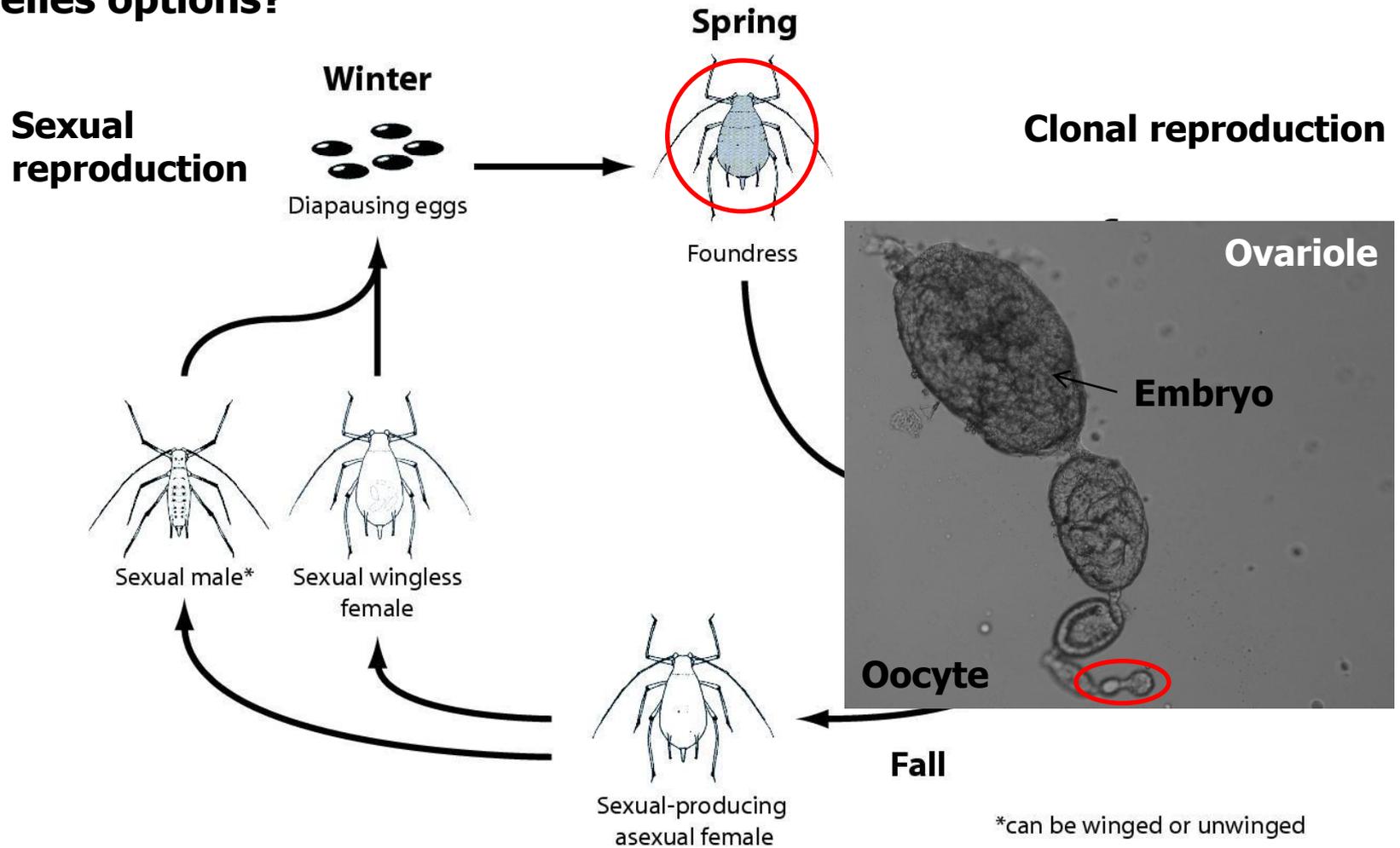
Application du TALEN au modèle puceron

Quelles options?



Application du TALEN au modèle puceron

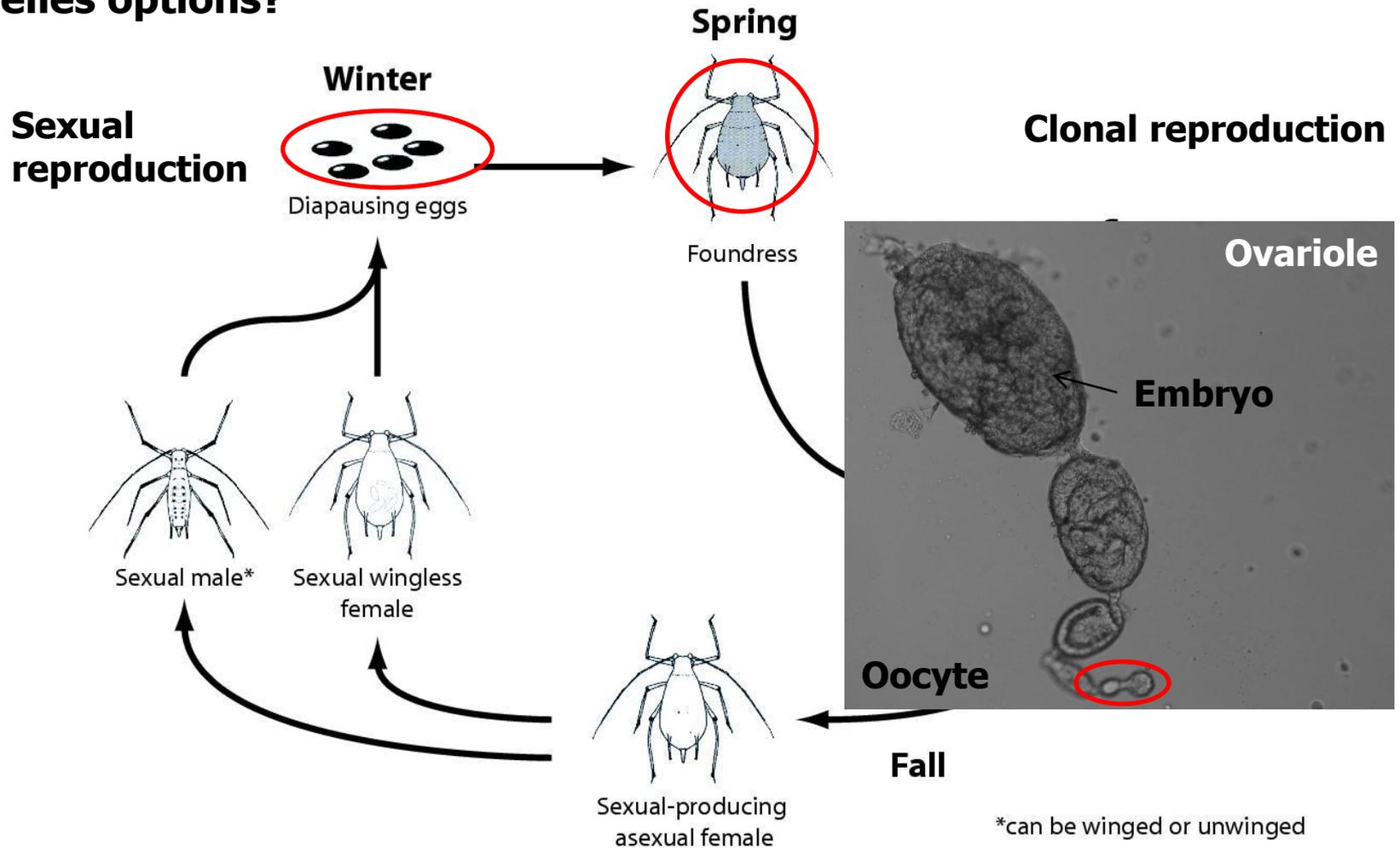
Quelles options?



Injection des **individus parthénogénétiques**: cibler le stade ovocyte/pre-ovocyte

Application du TALEN au modèle puceron

Quelles options?



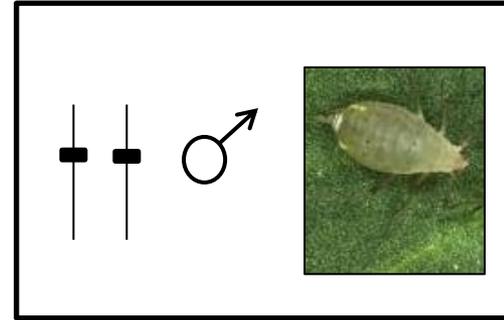
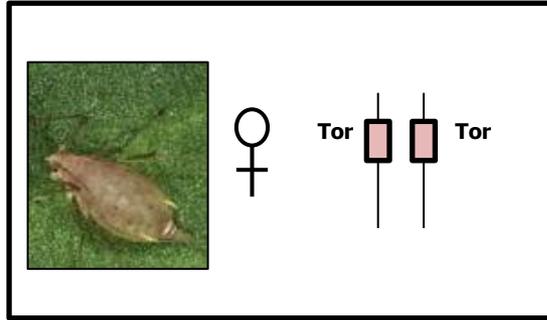
Injection des **Oeufs**: cibler le **stade 1 cellule** (juste après la ponte)

Injection des **individus parthénogénétiques**: cibler le stade ovocyte/pre-ovocyte

Application du TALEN au modèle puceron

Stratégie de croisement

JML06
L9Ms14

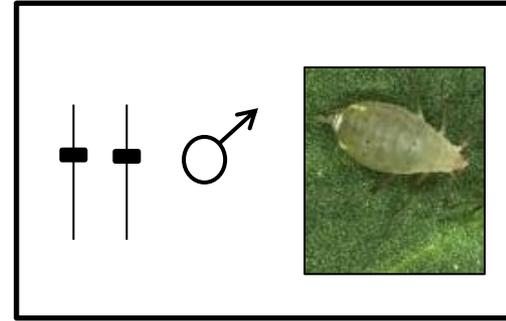
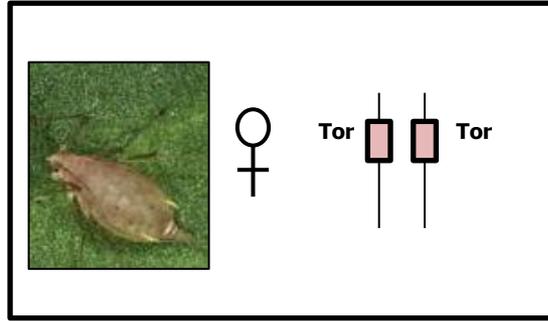


L6Mo02

Application du TALEN au modèle puceron

Stratégie de croisement

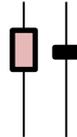
**JML06
L9Ms14**



L6Mo02

♀

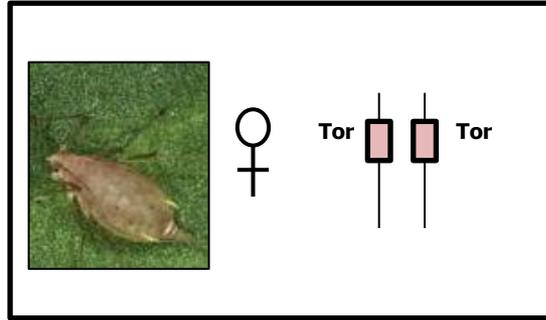
**Injection d'individus
parthénogénétiques au
stade L3**



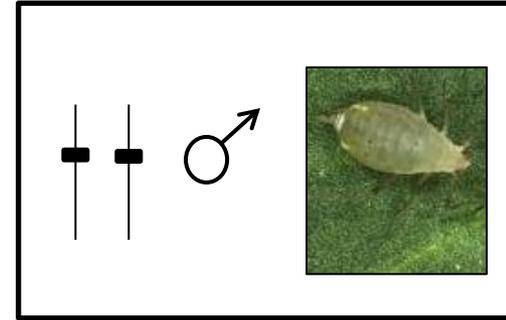
Application du TALEN au modèle puceron

Stratégie de croisement

**JML06
L9Ms14**



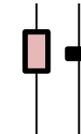
L6Mo02



**Injection d'individus
parthénogénétiques au
stade L3**



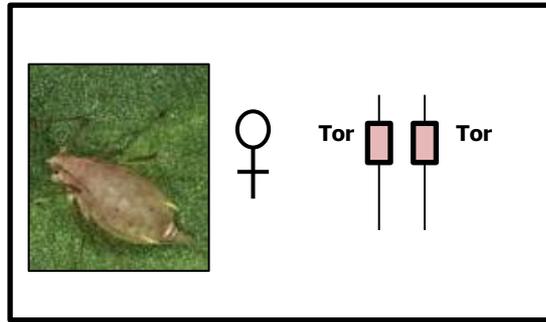
**Injection d'oeufs
fertilisés juste
après dépôt**



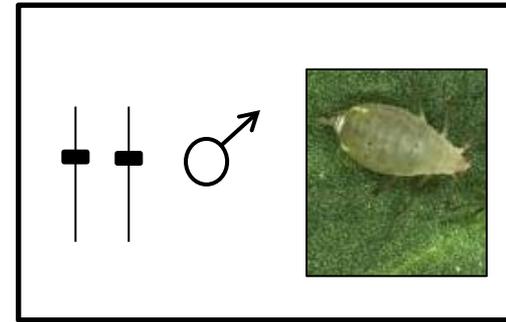
Application du TALEN au modèle puceron

Stratégie de croisement

**JML06
L9Ms14**



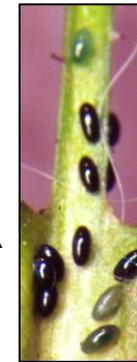
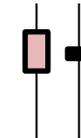
L6Mo02



**Injection d'individus
parthénogénétiques au
stade L3**



**Injection d'oeufs
fertilisés juste
après dépôt**

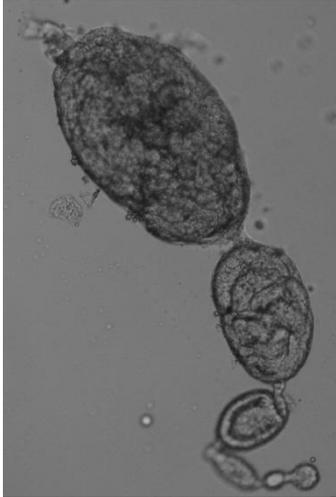


Si knock-out: Pucerons **Verts** et non **Roses**

Application du TALEN au modèle puceron

1. Injection d'individus parthénogénétiques

Utilisation du **Nanoject II** pour injecter **23 nL** de TALEN (900 ng/uL) dans des individus L3

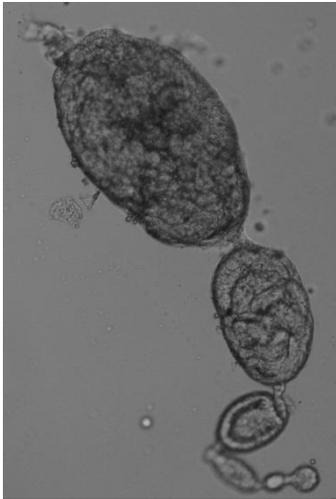


- Au stade L3: environ **4 embryons par ovariole** qui ont dépassé le stade ovocyte 1 cellule, soit environ **$14 \times 4 = 50$ embryons**
- Si le TALEN atteint effectivement les **ovocytes stade 1 cellule**, on s'attend à voir des « mutants » après le 50^{ème} individu produit

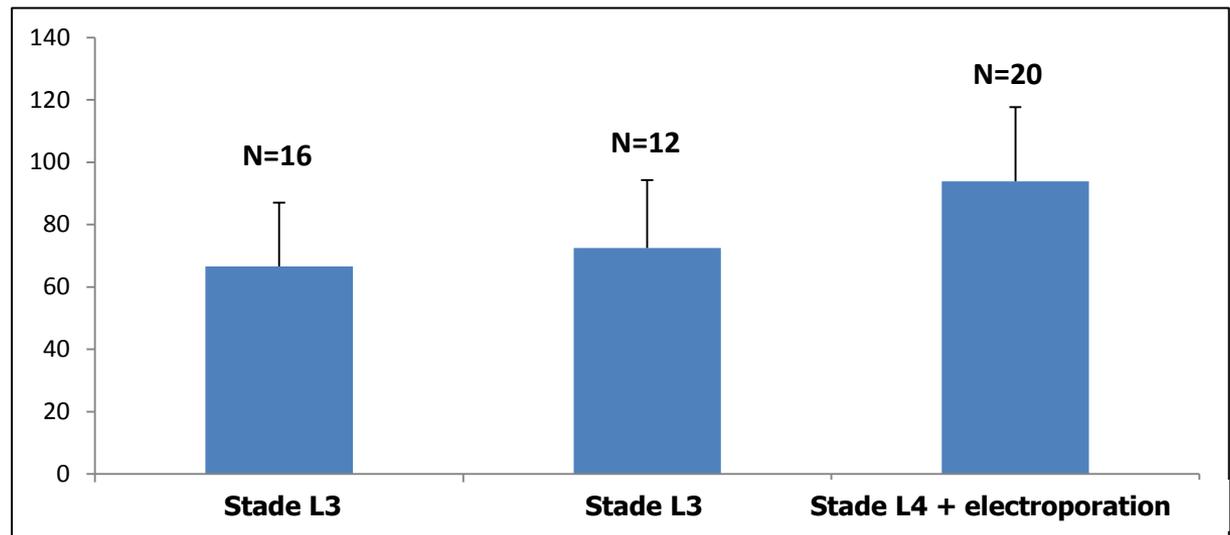
Application du TALEN au modèle puceron

1. Injection d'individus parthénogénétiques

Utilisation du **Nanoject II** pour injecter **23 nL** de TALEN (900 ng/uL) dans des individus L3



- Au stade L3: environ **4 embryons par ovariole** qui ont dépassé le stade ovocyte 1 cellule, soit environ **14*4=50 embryons**
- Si le TALEN atteint effectivement les **ovocytes stade 1 cellule**, on s'attend à voir des « mutants » après le 50^{ème} individu produit



Le descendance de 50 individus injectés a été suivie, soit 4000 individus: **pas de mutant**

- Les 2 ARNm doivent franchir plusieurs barrières pour atteindre les ovocytes: ???

Application du TALEN au modèle puceron

2. Injection d'œufs fertilisés

Paramètres clefs

➤ Equipement

Visite du laboratoire d'Eric Marois et Stéphanie Blandin qui injectent en routine des œufs de moustique



Application du TALEN au modèle puceron

2. Injection d'œufs fertilisés

Paramètres clefs

➤ Equipement

Visite du laboratoire d'Eric Marois et Stéphanie Blandin qui injectent en routine des œufs de moustique



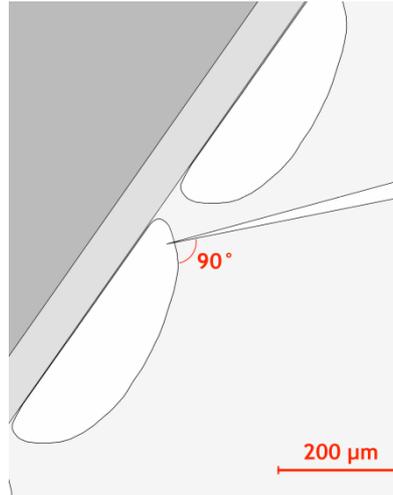
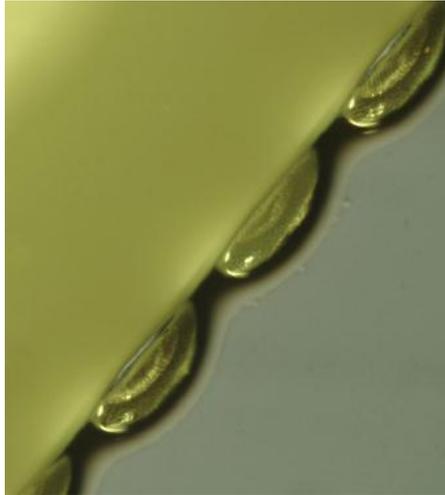
Injecteur = FemtoJet (Eppendorf)

Machine à étirer des capillaires en Quartz = P2000 Laser-based Micropipette Puller (Sutter)

Disponibles localement sur une plateforme à Rennes

Application du TALEN au modèle puceron

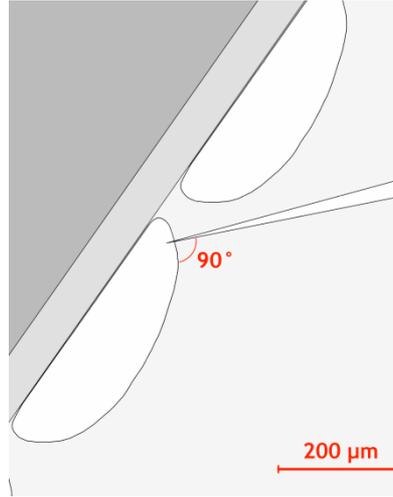
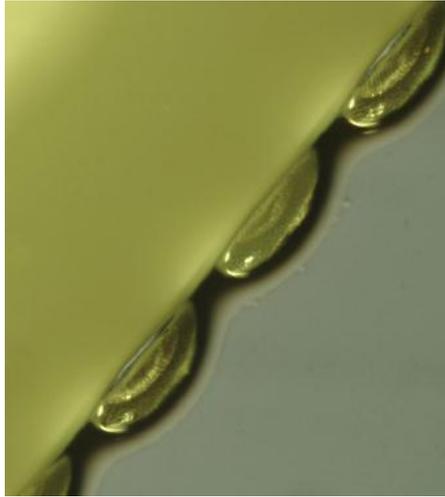
➤ Méthode d'injection



- ✓ **Alignement** des œufs le long d'un buvard humide
- ✓ **Injection** d'un volume maximum dans l'œuf
- ✓ Seuls les **œufs mélanisés** sont conservés
- ✓ Traitement des œufs à l'eau de Javel 5% avant la diapause

Application du TALEN au modèle puceron

➤ Méthode d'injection



- ✓ **Alignement** des œufs le long d'un buvard humide
- ✓ **Injection** d'un volume maximum dans l'œuf
- ✓ Seuls les **œufs mélanisés** sont conservés
- ✓ Traitement des œufs à l'eau de Javel 5% avant la diapause

➤ Le choix du croisement

- ✓ **L6*L9** = 500 femelles avec 300 mâles
- ✓ Production d'œufs **variable** et **faible** (20 à 200...)
- ✓ Mauvais croisement utilisé pour de la **mise au point**: injection d'H₂O et observation d'**œufs mélanisés** puis de quelques **éclosions** après diapause

Application du TALEN au modèle puceron

- ✓ **Dernière expérimentation**: nouveau croisement (JML06 * L6Mo02)

Injection de 900 ng/ul de solution TALEN

400 œufs **injectés**



70 œufs mélanisés



Taux de mélanisation: **17,5 %**



Application du TALEN au modèle puceron

✓ **Dernière expérimentation:** nouveau croisement (JML06 * L6Mo02)

Injection de 900 ng/ul de solution TALEN

400 œufs **injectés**



Taux de mélanisation: **17,5 %**

70 œufs mélanisés



Taux d'**éclosion**?



Effet du TALEN?



Résultats en Février..



Application du TALEN au modèle puceron

- ✓ **Dernière expérimentation**: nouveau croisement (JML06 * L6Mo02)

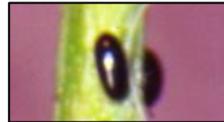
Injection de 900 ng/ul de solution TALEN

400 œufs **injectés**



Taux de mélanisation: **17,5 %**

70 œufs mélanisés



Taux d'**éclosion**?



Effet du TALEN?



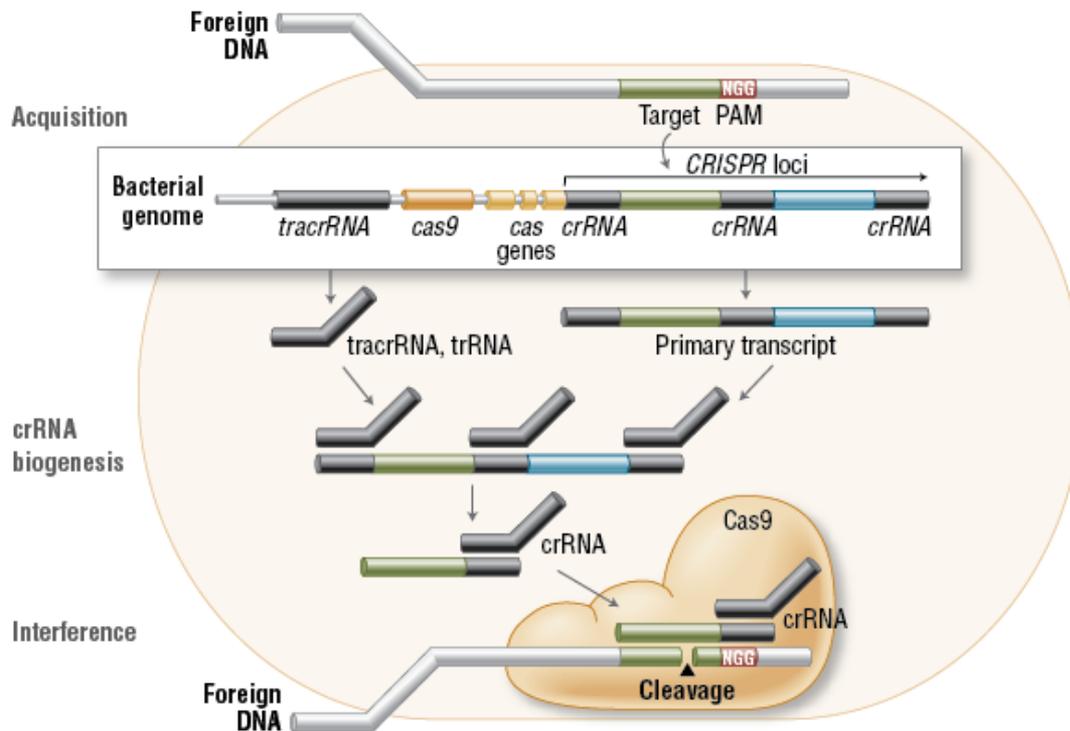
Résultats en Février...



- ✓ Mais **plusieurs paramètres** restent à **optimiser** et notamment avoir un croisement qui produit **plus d'œufs** pour ne garder que les **œufs très jeunes** (meilleure mélanisation après injection: pression osmotique moins forte...)
- ✓ Combien de temps dure le **stade 1 cellule**? Analyses de microscopie cellulaire nécessaires

Une autre possibilité: le système CRISPR/Cas9

- ✓ Chez les bactéries, **CRISPR** (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic repeats) et **CRISPR-associated genes** (Cas) sont essentiels pour l'immunité et notamment l'élimination de matériel génétique invasif



1. ADN « étranger » incorporé dans le **loci CRISPR** du génome

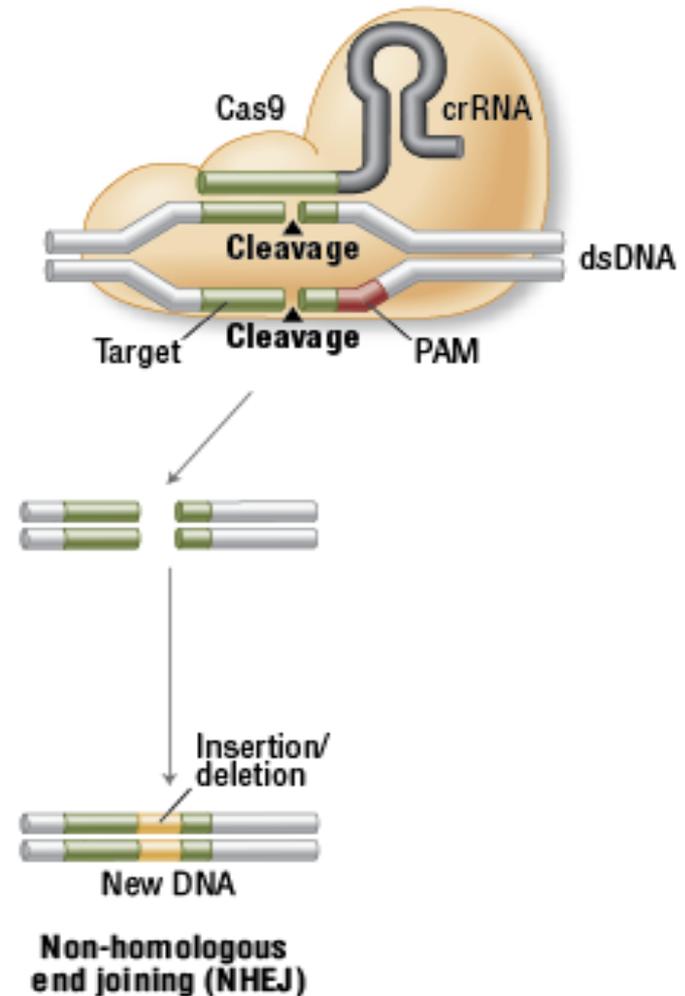
2. Le loci CRISPR est ensuite transcrit en **crRNA** qui interagit avec un **tracrRNA**

3. La **complémentarité** de **20 nt** entre le **crRNA** et l'ADN étranger permet le clivage de ce dernier par l'action de l'endonuclease **Cas9**

Une autre possibilité: le système CRISPR/Cas9

- ✓ Type II CRISPR system simplifié: tacrRNA et crRNA combinés en un **sgRNA** (single guide RNA)
- ✓ Reconnaissance **d'une séquence de 20 nt** puis clivage de l'ADN génomique correspondant par l'activité de **Cas9**
- ✓ Réparation du clivage par Non-Homologous End Joining (NHEJ) pathway

A. Genome Engineering With Cas9 Nuclease

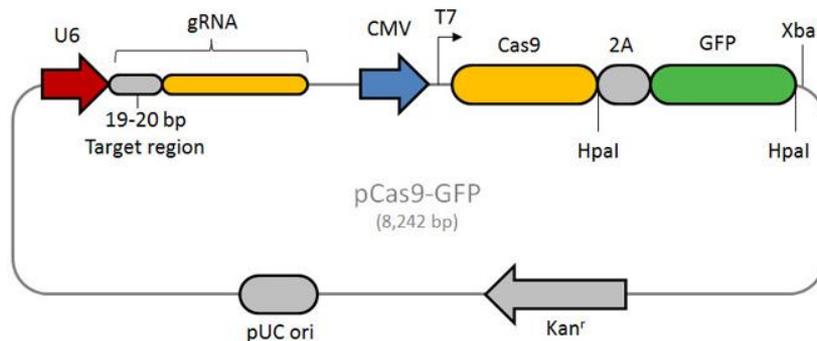


Une autre possibilité: le système CRISPR/Cas9

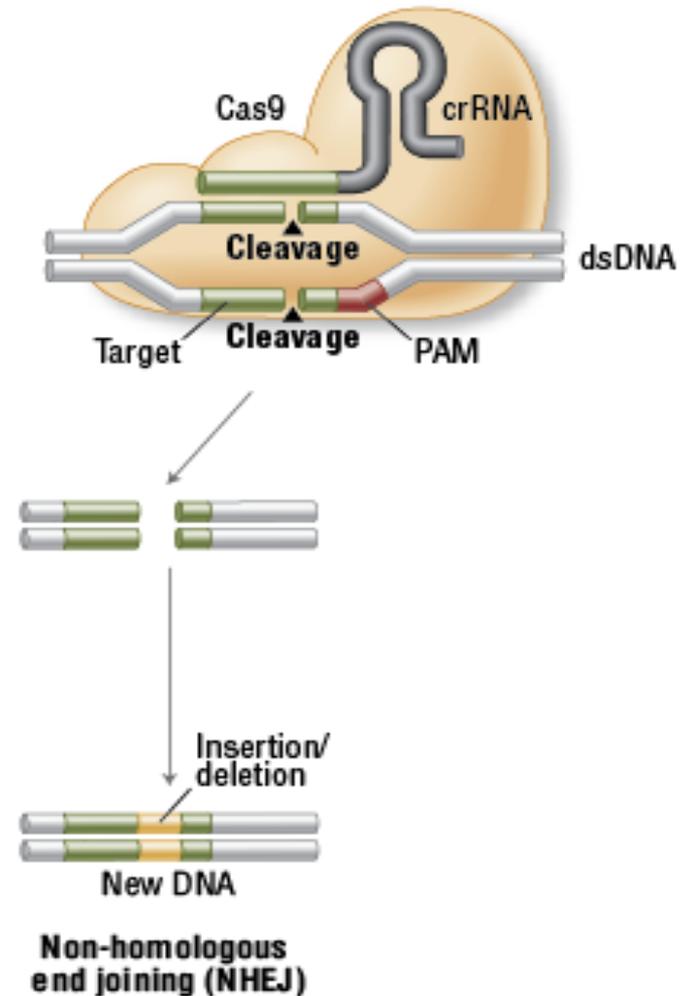
- ✓ Type II CRISPR system simplifié: tacrRNA et crRNA combinés en un **sgRNA** (single guide RNA)
- ✓ Reconnaissance **d'une séquence de 20 nt** puis clivage de l'ADN génomique correspondant par l'activité de **Cas9**
- ✓ Réparation du clivage par Non-Homologous End Joining (NHEJ) pathway

Principe:

Injection d'un **sgRNA** (contre la partie spécifique du gène à muter) et d'un **ARNm codant pour Cas9**



A. Genome Engineering With Cas9 Nuclease



Le projet « Mutagénèse chez le puceron »



Sylvie Tanguy



Sylvie Hudaverdian



Denis Tagu



Stéphanie Morlière



Akiko Sugio



Jean-René Huynh



Eric Marois



Financements:

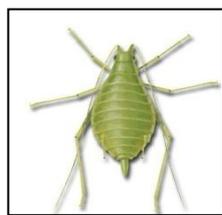
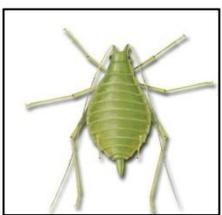


Projet **INRA SPE**
Bourse **Marie Curie** Akiko Sugio



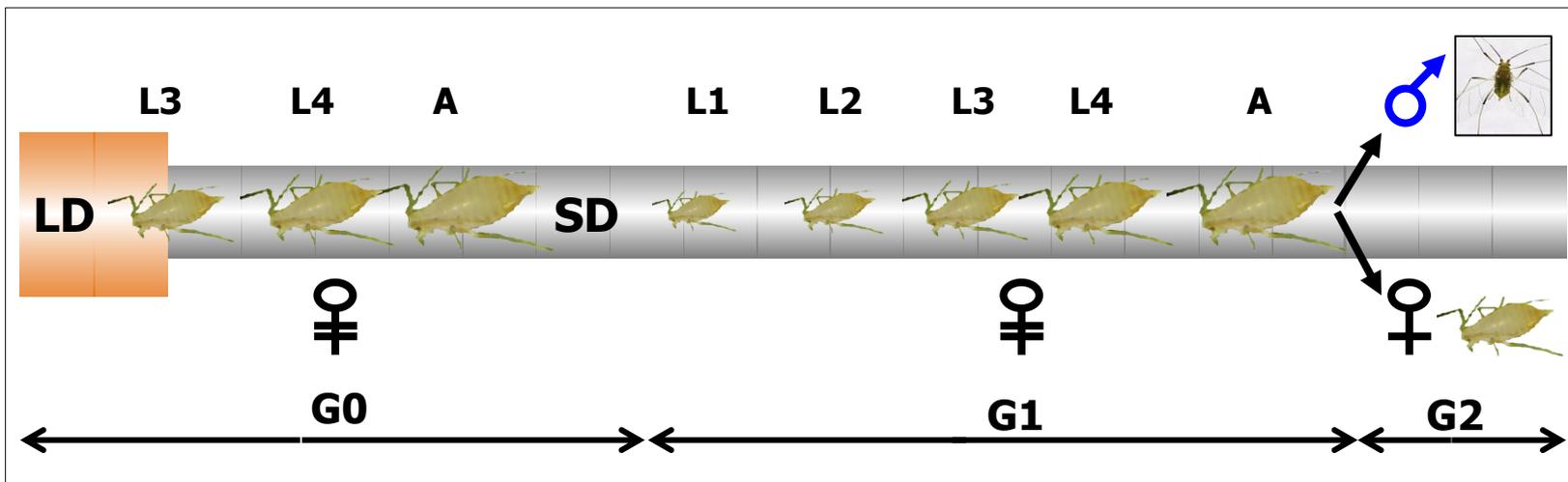
Specificity of the aphid model

Femelle
AA XX



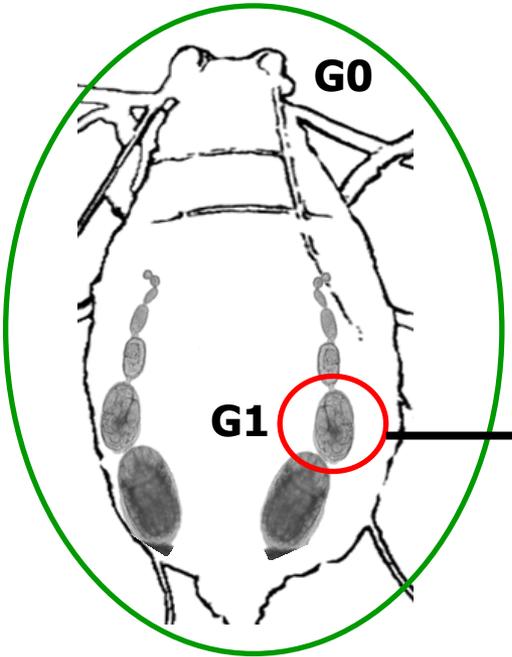
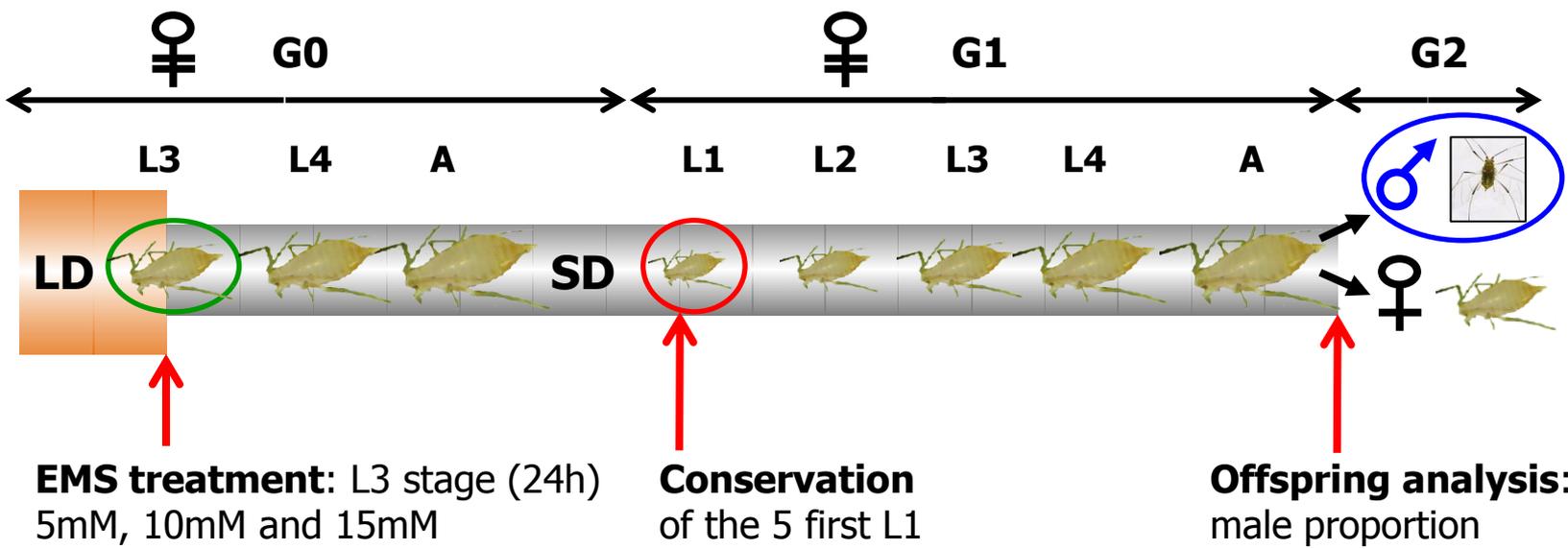
Mâle
AA X0

- **Any** lethal mutation **on the X** would **kill males**
- **Males proportion** within the progeny of treated individuals can be used as a **digital readout** to estimate the **occurrence of X-linked mutations**
- Specific **sexual morphs induction** protocol

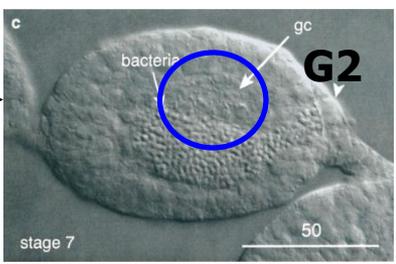


How **adapting this protocol** to **EMS treatment**?

1. Efficiency of EMS mutagenesis



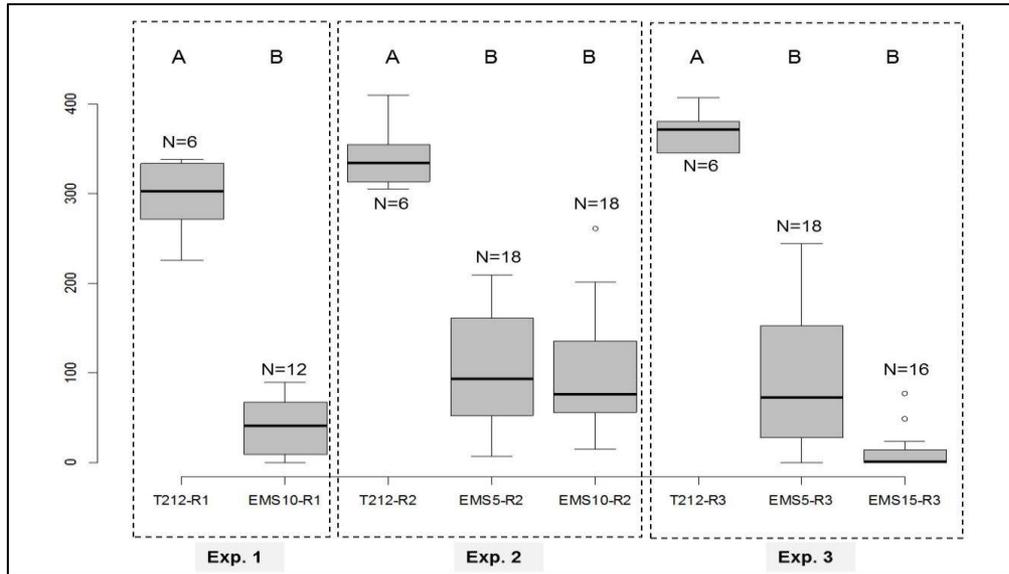
EMS + Coomassie blue: only "blue" L1 are conserved as an indirect proof of EMS ingestion



- EMS might **target:**
- the **G0:** EMS-fed aphids
 - their **embryos:** the **future G1**
 - the **germline of these embryos:** the future G2, including males

1. Efficiency of EMS mutagenesis

FECUNDITY



➤ **Reduced fecundity** for treated aphids at any [EMS] and high **toxicity** at **15mM**

SEX RATIO = M / (M+F)

Experiment	Treatment	Sex Ratio
1	Control 0mM	0,40
	EMS 10 mM	0,27
2	Control 0mM	0,57
	EMS 5 mM	0,33
	EMS 10 mM	0,13
3	Control 0mM	0,56
	EMS 5 mM	0,33
	EMS 15 mM	0,17

➤ **Males proportion** significantly **reduced** (Khi2-test) in EMS-treated aphids progeny

➤ **EMS** treated aphids might carry **lethal mutations** on the **X** in their germline: **reduced male production**

EMS treatment seems to be **efficient** to generate **mutational events**