

Informe final publicable de proyecto

Manejo Integrado de *Drosophila suzukii* en fruta fina: Claves químicas involucradas en la técnica del insecto estéril y el control biológico con parasitoides

Código de proyecto ANII: FMV_1_2019_1_156089

16/08/2023

GONZÁLEZ RITZEL, Andrés (Responsable Técnico - Científico)

DE LA VEGA, Gerardo (Co-Responsable Técnico-Científico)

PEREYRA, Jessica (Investigador)

ROSSINI CARIDAD, Carmen (Investigador)

TRIÑANES, Federico (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE QUÍMICA (Institución Proponente) \\
FACULTAD DE QUÍMICA. FUNDACIÓN PARA EL PROGRESO DE LA QUÍMICA

Resumen del proyecto

La mosca de alas manchadas, *Drosophila suzukii*, es una especie asiática plaga de fruta de piel fina. Se ha expandido mundialmente y en Uruguay fue detectada por primera vez en 2015, expandiéndose en años subsecuentes. El objetivo general de este proyecto fue generar una base de conocimiento desde la Ecología Química para el desarrollo de dos estrategias complementarias de control sustentable de *D. suzukii*: el control biológico con parasitoides y la técnica del insecto estéril (TIE). Se realizó un relevamiento de parasitoides de drosófilidos, reportando tres especies presentes en país en forma silvestre. Se montaron crías de estas especies y de *D. suzukii* para abordar el proyecto con diversas técnicas biológicas y químicas. Entre éstas, bioensayos de comportamiento en olfatómetro, medida de respuesta electrofisiológica a compuestos volátiles, análisis químico de volátiles e irradiación de insectos. Como resultados generales, se demostró que la presencia de larvas de *D. suzukii* en desarrollo dentro de frutos de arándanos y frutillas, cambia significativamente el perfil de olores de estas frutas. Asimismo, estos olores atraen en forma diferencial al parasitoide de pupas *Trichopria anastrephae*, en relación a los olores provenientes de fruta sana. En apoyo a estos resultados comportamentales, se reporta por primera vez que las hembras de parasitoides de drosófilidos detectan olfativamente, a nivel de sus antenas, compuestos volátiles frutales, abriendo posibilidades para la utilización de estos compuestos en el desarrollo de estrategias de control biológico. Finalmente, en nuestro proyecto se realizó por primera vez en el país la esterilización de insectos por irradiación, con el objetivo de desarrollar la TIE, y se desarrollaron técnicas para la evaluación de la capacidad de machos irradiados para detectar y responder a estímulos olfativos asociados a la presencia de las hembras, un aspecto clave para evaluar la competitividad de los machos irradiados en condiciones de campo.

Ciencias Agrícolas / Agricultura, Silvicultura y Pesca / Agricultura / Sanidad Vegetal / Ecología química

Palabras clave: *Drosophila suzukii* / Semioquímicos / Control Biológico /

Introducción

La mitigación ambientalmente sostenible de plagas agrícolas es un desafío importante para la producción y seguridad alimentaria. A las plagas nativas se les suma un número creciente de plagas exóticas, debido a introducciones accidentales producto del traslado de personas, mercaderías o maquinarias.

La mosca de alas manchadas, *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae), es una especie asiática plaga de fruta de piel fina (frutillas, arándanos y frambuesas, entre otras). Se ha expandido mundialmente (Bolda et al. 2010) y en Uruguay fue detectada por primera vez en 2015 en Canelones en cultivos de arándanos (González et al. 2015); dos años más tarde fue reportada en todo el centro-sur del país (Lauyé, 2017).

Las hembras depositan sus huevos en el interior de fruta inmadura. Las larvas eclosionadas se alimentan de ésta ocasionando importantes pérdidas productivas (Walsh et al. 2011). La incidencia próxima a la cosecha de la fruta limita el uso de insecticidas, al ser inadmisibles residuos en fruta de consumo fresco. Existen además reportes de resistencia desarrollada a insecticidas (Gress & Zalom, 2019).

Estrategias de manejo alternativas a los insecticidas han sido exploradas a nivel internacional. Entre las más consideradas y promisorias se destacan el control biológico con parasitoides y la Técnica del Insecto Estéril (TIE) (Lee et al. 2019; Homem et al. 2022). El objetivo general de este proyecto fue generar una base de conocimiento nacional, desde un abordaje de la Ecología Química, para el desarrollo de estas dos estrategias de control sostenible de *Drosophila suzukii*.

Primeramente, se realizó un relevamiento de especies de parasitoides presentes en Uruguay, potenciales biocontroladores de *Drosophila suzukii*. Los parasitoides son insectos cuyo desarrollo depende de otro insecto denominado hospedero, del cual se alimenta en los estadios inmaduros. Cuando el hospedero es un insecto plaga, los parasitoides pueden utilizarse como herramientas de control biológico de plagas (Ehler, 2006). Como resultado de nuestro trabajo de relevamiento, hemos encontrado poblaciones silvestres y hemos establecido crías de dos especies capaces de desarrollarse en *D. suzukii*; *Pachycrepoideus vindemmiae* (Hymenoptera: Pteromalidae) y *Trichopria anastrephae* (Hymenoptera: Diapriidae).

Un aspecto fundamental en la eficiencia controladora de los parasitoides es su capacidad para encontrar hospederos, utilizando entre otras claves, información química. El primer objetivo específico del proyecto fue determinar la capacidad de los parasitoides de drosófilidos presentes en Uruguay de responder a claves químicas indicadoras de la presencia de *D. suzukii* en frutos. Esto implicó una caracterización de los compuestos químicos volátiles de frutos susceptibles a *D. suzukii*, como resultado de la infestación de la mosca, para posteriormente evaluar si esta información puede ser utilizada

por los parasitoides en la búsqueda de hospederos. Para esto se utilizaron dos abordajes, uno comportamental para evaluar la respuesta del parasitoide ante la clave olfativa mediante bioensayos de olfatometría, y otro fisiológico mediante la técnica de electroantenograma (EAG).

Trabajamos con infestación controlada por *D. suzukii* en frutos de arándano y frutilla, y caracterización posterior de su perfil de volátiles, esperando encontrar diferencias química en los olores de frutos sanos e infestados. Seguidamente, trabajamos con hembras adultas de los parasitoides a nivel comportamental, comparando la atracción a frutos infestados por *D. suzukii* en comparación con frutos sanos, esperando encontrar una preferencia de las hembras hacia frutos infestados por su insecto hospedero. Finalmente, trabajamos con antenas de las hembras parasitoides, esperando encontrar respuestas olfativas a compuestos característicos de frutos infestados.

El segundo abordaje fue el de la TIE, una estrategia promisorio para la mitigación de *D. suzukii* a nivel global (Homem et al. 2022). Ésta se basa en la esterilización de insectos de cría tras exposición a radiación ionizante, y la liberación de estos insectos como agente de control, el cual se logra por la cópula entre hembras silvestres fértiles y machos estériles, disminuyendo el potencial reproductivo de la especie plaga (Knipling, 1955). La efectividad de la técnica depende de cuán competitivos sean los machos estériles en relación a los silvestres por acceso a cópulas en la naturaleza (Calkins & Parker, 2005). El segundo objetivo específico propuso determinar la capacidad competitiva de machos de *D. suzukii* esterilizados por irradiación, en relación a la utilización de claves químicas para localizar hábitats asociados a la presencia de hembras.

El abordaje inicialmente planificado fue la obtención de pupas irradiadas en Argentina y el trabajo local en la evaluación de competitividad. Por dificultades logísticas se trabajó finalmente con irradiación local, lo cual fue finalmente un logro relevante ya que por primera vez se esterilizaron insectos en Uruguay con el objetivo de desarrollar la TIE. Se criaron y esterilizaron pupas de *D. suzukii*, se determinó el grado de esterilización para una dosis inicial de radiación, y se evaluó la respuesta olfativa de los machos irradiados a volátiles frutales que representan claves químicas de hábitats con probable presencia de hembras *D. suzukii*. Se esperaba determinar dosis de irradiación que resultaran en una esterilización óptima, sin afectar la respuesta olfativa y comportamental de los machos en comparación con machos silvestres.

Metodología/diseño del estudio

Para desarrollar este proyecto en sus dos objetivos específicos, se requirieron recursos humanos formados y en formación, y se utilizaron un conjunto de experticias, equipamientos e insumos, que se describen brevemente a continuación.

A) Crías estables de insectos: adultos de *Drosophila suzuki* y de sus parasitoides fueron requeridos durante la extensión del proyecto, por lo que se mantuvieron crías de laboratorio en condiciones controladas.

B) Análisis químico de compuestos volátiles en vivo (olores) de fruta: Esta tarea requiere experticia química que nuestro grupo ha desarrollado a través de los años, y equipamiento adecuado de cromatografía de gases y espectrometría de masas.

C) Análisis de respuesta olfativa por electroantenograma: la detección de olores en insectos ocurre mediante receptores olfativos ubicados mayormente en las antenas. Estos receptores transducen la información química del ambiente en aferencias eléctricas, las cuales podemos registrar en esta técnica. Asimismo, esta técnica puede acoplarse a un cromatógrafo de gases (GC-EAD) para dilucidar qué compuestos específicos presentes en una mezcla compleja como los olores de una planta, son específicamente detectados por las avispas. Nuestro grupo de trabajo es el único en el país que ha desarrollado la experticia y el equipamiento para medir la respuesta olfativa en insectos.

D) Análisis de respuesta comportamental en insectos: Los olfatómetros son un conjunto de dispositivos para evaluar, en el laboratorio y en condiciones controladas, la respuesta de insectos en relación a estímulos olfativos (olores) de diversas fuentes, sin contacto visual. Estas metodologías suelen requerir un desarrollo ad-hoc para cada tipo de insecto, y forma parte de las metodologías de uso común en nuestro grupo. Para este proyecto se utilizó un olfatómetro de dos brazos para evaluar la atracción de parasitoides a olores de fruta, y se desarrolló un nuevo dispositivo para la evaluación de atracción de *Drosophila suzukii* a fuentes de olor.

E) Irradiación de insectos: En el marco de este proyecto se estableció una nueva colaboración interinstitucional con el Centro de Investigaciones Nucleares de la Facultad de Ciencias, para irradiar insectos en estado de pupa. Esta colaboración resultó en las primeras experiencias de irradiación de insectos en el país, y trascendiendo a este proyecto marca un camino potencial a desarrollar esta técnica en Uruguay.

En cuanto a la metodología de trabajo, en primer lugar nos propusimos evaluar el impacto de *D. suzukii* a nivel de la química volátil de arándanos y frutillas para determinar si esta información es detectada y utilizada por los parasitoides nativos en la búsqueda de hospederos. Para esto se propuso comparar los perfiles químicos de la fruta infestada por la

mosca en relación a la misma fruta madurada naturalmente sin infestación.

La caracterización de los compuestos orgánicos volátiles comprende dos etapas, primero capturar dichos compuestos a través de un sistema de colecta y, a continuación, una etapa analítica para separar, identificar y cuantificar los compuestos presentes en esa muestra. En general, el sistema de colecta consistió en confinar el material vegetal en un recipiente con una entrada y una salida controlada de aire (0.3-0.5 L/min) durante 24 horas, en ésta última se disponía el material adsorbente (50 mg de HaySep Q) donde los volátiles arrastrados por las corrientes de aire eran retenidos.

Primeramente, procuramos seleccionar frutos sin daños visibles e imperfecciones. En el caso de los arándanos (*Vaccinium* spp.), trabajamos con frutos orgánicos cosechados proveídos por el establecimiento La Micaela, Canelones, Uruguay (<http://lamicaelaorganico.com/>). Cada colecta se realizó sobre 25 gramos de arándanos (~ 15 unidades) dispuestos en cilindros de colecta de vidrio. Entretanto, las frutillas (*Fragaria x ananassa*) utilizadas pertenecían a la variedad INIA Yrupé, un producto del programa de mejoramiento genético de hortalizas de 2019. En este caso, se colectaban individualmente los volátiles de una frutilla por planta encerradas en bolsas de poliéster. Tras una colecta inicial, cada muestra era arbitrariamente clasificada en uno de los tratamientos; frutas libres de daño e infestadas por *D. suzukii*. En arándanos evaluamos, además, dañados artificialmente (tres perforaciones por fruto con micro-capilares de 5 µm) emulando el daño superficial de la fruta realizado durante la oviposición de la mosca.

La infestación de la fruta por *D. suzukii* se realizó controladamente con moscas de 2 a 7 días de edad durante 24 horas. Los arándanos eran infestados por 10 hembras y el grado de infestación era constatado bajo lupa tras la remoción de las moscas, mientras las frutillas se infestaron con tres hembras y la infestación se corroboraba a través de inmersiones de la fruta en una solución saturada, de acuerdo con Dreves et al. (2014), una vez culminada la última colecta de volátiles. A continuación, los frutos eran incubados bajo las condiciones óptimas de cría durante 10 días, tiempo prudente para alcanzar el estadio de pupa hospedero de los parasitoides (Tochen et al. 2014), para repetir el procedimiento de colecta al décimo día. En el caso de las frutillas, se adicionó una colecta intermedia a los 5 días posteriores a la infestación.

En ambos casos, los volátiles adsorbidos eran eluidos con hexano (1 mL), se les adicionó tridecano (100 µL) como estándar interno y las muestras se almacenaron en frío (-20 °C) hasta su análisis por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Las muestras eran concentradas llevadas a 100-150 µL bajo corrientes de N₂ previa a su inyección en el equipo analítico, Shimadzu QP 2010 PLUS (Shimadzu Corp., Tokyo, Japón), equipado con una columna Rtx®-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, Alltech, USA). Las muestras (1 µL) fueron inyectadas en modo splitless con He como gas transportador a 1 mL/min (49.7 KPa). El programa de temperaturas fue el siguiente: 40 °C iniciales sostenidos por cuatro minutos, luego llevados a 150 °C a 5 °C/min y hasta 250 °C a 10 °C/min, y sostenida durante 10 minutos al alcanzar la temperatura máxima. La temperatura del inyector y la interfase con el MS fueron establecidas en 250 °C. La identificación y cuantificación de los compuestos volátiles fue realizada a través del software GCMS solution (Shimadzu GCMS Solution V 4.45SP1). Las muestras fueron previamente comparadas con colectas blanco (aire sin muestra) para eliminar los compuestos de fondo y poder comparar entre tratamientos propiamente los de las muestras de interés.

Una vez dilucidados los perfiles de volátiles, logramos establecer una metodología consistente para evaluar la respuesta a través de GC-EAD en parasitoides microhimenópteros de drosófilidos. A través de esta técnica evaluamos la respuesta de los parasitoides, *T. anastrephae* y *L. boulardi*, a los compuestos volátiles de frutillas a los días 5 y 10 posteriores a la infestación por *D. suzukii*. Los tiempos evaluados obedecen a los tiempos del desarrollo de los estadios hospederos de cada parasitoide.

El registro eléctrico fue realizado sobre antenas extirpadas de hembras adultos de 5 a 10 días de edad, con el escapo y el flagelómero apical removidos. Utilizamos electrodos de plata (Ag/AgCl) inmersos en solución Beadle-Ephrussi Ringer (NaCl 128 mM, KCl 4,7 mM and CaCl₂.2H₂O 1,9 mM) dentro de micro-capilares. La señal eléctrica es amplificada por la sonda de registro (10x; Syntech) y un amplificador IDAC-2 (Syntech). El GC utilizado fue un Hewlett-Packard (5890 series II) equipado con una columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, Alltech, USA) y un detector de ionización de llama (FID, por sus siglas en inglés). Un controlador de estímulo (CS-55; Syntech) entregaba aire humidificado constantemente ofreciendo a la antena los volátiles eluidos de la columna. Las respuestas eléctricas fueron obtenidas del software de GC-EAD de Syntech (v.2014).

A continuación, evaluamos la respuesta comportamental de *T. anastrephae* para determinar si las diferencias a nivel de la química volátil consecuencia de la infestación de *D. suzukii*, tanto sobre arándanos como en las frutillas, son discriminadas a distancia y son claves utilizadas para orientarse en la búsqueda de hospederos.

Los bioensayos consisten en registrar individualmente por única vez hembras adultas de entre dos a 7 días de edad, previamente alimentadas con agua-miel y apareadas, en un olfatómetro (tubo en Y; 6 cm de cada sección), durante 3-5 minutos. La preferencia por los estímulos volátiles es analizada en base a la permanencia temporal en las distintas secciones del dispositivo, la primera elección y la posición final del parasitoide.

En primer lugar, evaluamos la preferencia comportamental hacia arándanos infestados por *D. suzukii*. Esta estimulación química fue evaluada frente a arándanos libres de daño y aire limpio. Se excluyó de la evaluación comportamental el tratamiento de los arándanos dañados artificialmente dada la similitud química en relación al tratamiento libre de daño. De forma análoga, evaluamos el comportamiento frente a los olores de frutillas infestadas respecto a frutillas madurada naturalmente libre de daño. En ambos casos, la infestación de la fruta utilizada como estimulación en los bioensayos de olfatometría fue semejante al tratamiento realizado para las colectas de volátiles.

En cuanto a la TIE, la esterilización de los insectos se llevó a cabo en el Laboratorio de Radioquímica del Centro de Investigaciones Nucleares (CIN, Facultad de Ciencias) en un irradiador Gammacell 4000A con fuente de ^{60}Co . Las irradiaciones se realizaron en grupos de 500-1000 pupas a 24 horas de su emergencia con una dosis de 120 Gy. Esta dosis se corresponde con las reportadas por literatura de inducir 96% de esterilidad en machos de *D. suzukii* (Lanouette et al. 2017).

La calidad sensorial de la olfacción de los machos adultos de *D. suzukii* esterilizados con radiación gamma fue evaluada a través de EAG. Esta técnica permite establecer una relación entre la dosis ofrecida y la respuesta eléctrica periférica del insecto. Al ofrecer dosis crecientes de un determinado compuesto, uno puede realizar curvas dosis-respuesta y aproximar los umbrales de detección y saturación. Para esto, las moscas eran inmovilizadas en tips de pipetas automáticas y paralelamente se establecía un circuito eléctrico externo a través de micro-capilares de vidrio con electrodos de plata (Ag/Ag-Cl) en su interior, inmersos en solución salina conductora (solución Ringer *Drosophila*; NaCl 46 mM, KCl 182 mM, CaCl₂ 3 mM y Tris base 10 mM, pH = 7-7.5), conectados a un amplificador (combi-probe x10, Syntech) y a una fuente de registro de la señal eléctrica (IDAC-2, Syntech).

El procedimiento consiste en ofrecer sucesivos pulsos (4, en este caso) de aire que arrastran una determinada concentración del estímulo en un volumen definido (10 μL) diluida en el solvente adecuado (hexano) aplicado en papel de filtro (1 cm²) y, consecutivamente, prosigue una serie de concentración ascendente en escala logarítmica (0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 μg) para evitar saturaciones iniciales de la antena.

Evaluamos la relación dosis-respuesta para machos vírgenes de 2 a 10 días de edad irradiados con 120 Gy respecto a individuos salvajes (0 Gy). A su vez, estos bioensayos deben ser acompañados de ensayos de supervivencia, fertilidad y fecundidad. Esto implica la individualización de las pupas irradiadas para su sexado una vez emergidos los adultos, y así controlar su condición sexual, criar en medios con dieta artificial y realizar un seguimiento periódico a los individuos para realizar curvas de supervivencia.

Resultados, análisis y discusión

Crías de parasitoides y *Drosophila*

En el transcurso del proyecto mantuvieron crías de las moscas *Drosophila suzukii* y *Drosophila melanogaster*, ambas en dieta artificial, y de los parasitoides *Trichopria anastrephae* y *Pachycrepodeus vindemiae*. Asimismo, se colectó, identificó y estableció en cría una nueva especie de parasitoide, *Leptopilina boulandi* (Hymenoptera: Figitidae), especialista de larvas de *Drosophila*, y se adicionó a la cría estable una nueva línea de *T. anastrephae* procedente de otra población natural. Esta última especie, de distribución regional, es congénere de un eficiente bio-controlador comercializado en Europa para mitigar a *D. suzukii*, *Trichopria drosophilae* (Hymenoptera: Diapriidae), y es la especie más prometedora para su implementación en nuestra región (Vieira et al. 2020). Esto explica por qué fue la especie de parasitoides que recibió más atención durante el proyecto.

En todos los casos, las crías se mantuvieron exitosamente en escalas suficientes para los trabajos experimentales del proyecto, incluso a través de la pandemia y cierre parcial de los laboratorios. Sin embargo, es necesario un escalado de estas crías para avanzar hacia la escala de bioinsumo para uso en campo, un objetivo que se plantea como una continuación de este proyecto y está en etapa de postulación y evaluación.

Colecta de volátiles

Una vez identificados y cuantificados los compuestos volátiles de frutos, en el caso de los arándanos se prosiguió a analizar el perfil de volátiles de cada uno de los tratamientos; fruta infestada por *D. suzukii*, fruta sana y fruta dañada artificialmente, estos últimos como controles complementarios. En total se identificaron 24 compuestos, 9 de estos presentes únicamente en los arándanos infestados por *D. suzukii*. Entre estos 9 compuestos, el acetato de isoamilo es uno de los compuestos presentes en cantidades considerables y completamente ausente en los tratamientos control. Los compuestos en proporciones mayoritarias se corresponden con ésteres alifáticos de cadena corta.

La diferencia entre los perfiles químicos de los tres tratamientos fue analizada a través de un escalamiento multidimensional no-métrico (NMDS, por sus siglas en inglés), basada en la matriz cuantitativa de los volátiles y sus distancias según el índice de Bray-Curtis. El resultado del análisis muestra diferencias estadísticamente significativas

entre el perfil de volátiles de los arándanos infestados por *D. suzukii*, tanto con los arándanos dañados artificialmente como los arándanos sin dañar. A su vez, entre estos dos últimos tratamientos no se observan diferencias estadísticas. Estos resultados fueron publicados en una revista internacional arbitrada (de la Vega et al., 2021).

Entretanto, el perfil de volátiles de las frutillas fue analizado en base a los compuestos mayoritarios. Estos compuestos se corresponden a ésteres etílicos y de metilo encontrados típicamente durante el progreso de maduración de la fruta (Yan et al. 2018), cuyas proporciones en los momentos del desarrollo susceptibles a estos parasitoides fueron determinadas. El análisis a través del tiempo indica que existen diferencias cuantitativas a través del tiempo dentro de los tratamientos, y entre los tratamientos al décimo día post-infestación, cuando se estima que *D. suzukii* entra en fase de pupa. La infestación de *D. suzukii* está asociada a un incremento en la cantidad de los ésteres etílicos emitidos con el progreso de la infestación, mientras en las frutillas libres de daño el éster metílico es el predominante e incrementa en el tiempo. Esta diferencia observada a nivel de la química volátil es concordante con los bioensayos comportamentales desarrollados a continuación. Aunque estos resultados se encuentran en preparación de una publicación, se han comunicado en foros especializados (Triñanes et al., 2022a).

Electrofisiología parasitoides

Las técnicas de electrofisiología (EAG o GC-EAD entre otras) permiten identificar potenciales semioquímicos involucrados en el establecimiento de las interacciones entre organismos, en este caso volátiles de fruto infestado y parasitoides de *Drosophila*. Este conocimiento abre una serie de posibilidades relacionadas a la manipulación del comportamiento de los enemigos naturales para incrementar la incidencia sobre la especie plaga. Por ejemplo, la preservación de éstos en los agro-ecosistemas, el entrenamiento de parasitoides generalistas para optimizar la búsqueda de hospederos, así como evitar ciertos compuestos en sistemas de trapeo masivo para no afectar las poblaciones de enemigos naturales.

Hasta el momento, no habían sido reportadas la aplicación de técnicas electroantagráficas en parasitoides de especies de *Drosophila*. A través de la técnica de GC-EAD se identificaron compuestos detectados por el sistema olfativo de los parasitoides *T. anastrephae* y *L. boulardi*, compuestos volátiles emitidos asociados a la infestación de *D. suzukii* en plantas de frutilla (*Fragaria x ananassa*) a dos tiempos post-infestación. Estos se corresponden con los compuestos mayoritarios en ambas muestras evaluadas; butanoato de etilo, hexanoato de etilo y hexanoato de metilo, tres ésteres de típica aparición durante el progreso de la maduración de la fruta. Estos resultados confirman la capacidad de los parasitoides de explotar compuestos volátiles de fruto en la búsqueda de sus hospederos, y abren las posibilidades de nuevos estudios orientados al desarrollo de control biológico de *Drosophila suzukii* en el país. Los resultados de este componente del proyecto se han publicado transitoriamente en el repositorio BioRxiv (Triñanes et al., 2022b).

Respuesta comportamental parasitoides

Los ensayos comportamentales de olfatometría con ambas frutas demostraron que *T. anastrephae* se orienta hacia la fruta infestada asociada a la presencia de su hospedero. En ambos casos, estos olores desencadenan una movilidad elevada en las avispas, y los parámetros evaluados (primera elección, tiempo de residencia y posición final) son favorables a la fruta infestada por *D. suzukii*. Las variables binomiales se analizaron a través de test binomiales ajustando la probabilidad de éxito (1/2 para la primera elección y 1/3 para la posición final), entretanto, los tiempos en cada sección fueron analizados a través del test de Mann–Whitney–Wilcoxon. Los resultados son concordantes con los resultados obtenidos sobre los perfiles de volátiles, la fruta infestada por *D. suzukii* presenta un perfil químico diferenciable al de la fruta sin infestación, y *T. anastrephae* es capaz de diferenciarlos a través de estímulos olfativos. Estos resultados fueron incorporados en los trabajos ya citados, para arándanos y frutillas, respectivamente (de la Vega et al., 2021; Triñanes et al., 2022a).

Irradiación y electrofisiología de machos estériles

La irradiación de pupas *D. suzukii* se realizó inicialmente a una dosis de 120 Gy, logrando una esterilidad mayor al 97% en machos y hembras. Se estima conveniente aumentar esta dosis para lograr esterilidad mayor al 99%, como se recomienda en el marco de la TIE. En cuanto a la supervivencia de los insectos irradiados, tanto la mediana de supervivencia (tiempo al que la probabilidad de supervivencia se reduce a la mitad) como la sobrevivencia de los individuos bajo seguimiento, no resulta afectada a causa de la irradiación a 120 Gy.

Mediante la técnica de EAG, se establecieron curvas dosis-respuesta para cuatro ésteres frutales cuya respuesta electroantagráfica ha sido reportada en la literatura para machos *D. suzukii*; hexanoato de etilo, hexanoato de metilo, butanoato de etilo y acetato de isoamilo (Cloonan et al. 2018; Revadi et al. 2015). Aunque aún no se han logrado las réplicas necesarias, los resultados indican que a la dosis de radiación de 120 Gy, no se afectan las respuestas olfativas a dos ésteres frutales ensayados. Estos resultados deben complementarse con más réplicas y más dosis de irradiación. Los ensayos comportamentales de machos irradiados se encuentran en progreso, por lo que no puede informarse un resultado en este aspecto.

Conclusiones y recomendaciones

En los últimos 15 años, *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) se consolidó mundialmente como una amenaza para la producción de fruta de piel fina ante la ausencia de estrategias efectivas para su mitigación, y Uruguay no es la excepción. Entre las múltiples estrategias consideradas se destacan el control biológico por parte de parasitoides microhimenópteros y la TIE, dos estrategias complementarias e inocuas con el medio ambiente. Nuestra propuesta abordó ambas estrategias desde la perspectiva de la Ecología Química de los bio-controladores.

Como primera conclusión de nuestro trabajo, en Uruguay existen en forma silvestre tres especies parasitoides de moscas del género *Drosophila*. Las tres especies se pueden criar en laboratorio, y son potenciales biocontroladores de *D. suzukii*. Aunque no son especies nativas, están naturalizadas y sus poblaciones adaptadas a las condiciones locales, por lo que sería necesario su introducción para el desarrollo de control biológico. Acompañando estudios internacionales en estas especies, ya que ocurren en otros países, se recomienda su consideración como potenciales biocontroladores, y realización de más estudios con poblaciones locales, desde su cría masiva hasta su potencial como controladores.

El diseño experimental nos permitió caracterizar el impacto de la infestación de *D. suzukii* a nivel de la química volátil de la fruta, identificar los compuestos percibidos por el sistema olfativo periférico de los parasitoides y posibles semioquímicos utilizados durante el proceso de búsqueda de hospederos. Las conclusiones de este componente del estudio es que la presencia de larvas *D. suzukii* desarrollándose dentro de la fruta cambia el perfil de volátiles de la misma. Esto es razonable dado que una larva en desarrollo dentro de un fruto cambiará muchas condiciones fisicoquímicas internas del mismo, en particular su perfil proteico y glucídico, por lo que un cambio en los perfiles de olores es de esperar, y este cambio será diferente en distintos frutos.

No era tan evidente, sin embargo, que los parasitoides pudieran detectar olfativamente y responder comportamentalmente a estos perfiles de olores frutales. Este descubrimiento abre posibilidades en dos líneas de trabajo: en primer lugar, compuestos atrayentes para parasitoides, por estar asociados a sus hospederos, pueden utilizarse exógenamente para manipular poblaciones de parasitoides, sean liberados o silvestres, para su arribo o permanencia en un cultivo. En segundo lugar, compuestos volátiles frutales percibidos por los parasitoides, pero diferentes en diversos frutos, pueden utilizarse para ensayar el aprendizaje asociativo en poblaciones de parasitoides en cría, de modo que asocien ciertos volátiles frutales con la presencia de hospederos. Este proceso, de ser posible, permitiría generar parasitoides "entrenados" previamente para distintos cultivos frutales, una estrategia de manejo de precisión que merece ser explorada.

En cuanto a la Técnica del Insecto Estéril (TIE), se procuró determinar si la esterilización mediante radiación gamma incide sobre la calidad sensorial de olfacción de los machos de *D. suzukii* como indicador de su competitividad en cuanto al uso de claves químicas volátiles señalizadoras de hábitats con presencia probable de hembras. En este punto, resultó ser una propuesta pionera a nivel país respecto a la utilización de técnicas nucleares para la esterilización de insectos, dando paso a su aplicación a otras especies de insectos problemáticos, tanto plagas agrícolas como vectores de enfermedades. La conclusión en este sentido es que Uruguay tiene la capacidad técnica de esterilizar insectos en volúmenes adecuados para la TIE, siendo la limitante el volumen de cría de los insectos de interés. En algunos casos esta limitante es un desafío mayor, no es el caso para *D. suzukii*, ya que pueden criarse en forma masiva mediante una inversión de recursos, logística y tiempo. Se considera muy relevante continuar en esta dirección. Por otra parte, el uso de técnicas como electroantenograma o respuesta comportamental pueden utilizarse para acompañar el proceso de ajuste fino de las dosis de irradiación, como proxy de la capacidad competitiva de los machos irradiado en campo.

Este proyecto y sus dos líneas de investigación han sido un disparador para el desarrollo de prácticas de mitigación complementarias y sostenibles para una especie plaga de relevancia mundial que está presente en Uruguay, aunque aún con daños menores. Anticipar medidas sostenibles de manejo, en el marco del cambio climático, es una recomendación ante la posible ocurrencia de condiciones más benévolas para el éxito de esta y otras especies de plagas entomológicas, medidas que a su vez pueden ser aplicables a otros insectos. La confluencia de la academia y el sector privado en el desarrollo de estas medidas es esencial, pero la escala del país es tal que el sector privado difícilmente vea atractivo el desarrollo en forma independiente.

Referencias bibliográficas

- Bolda, M. P., Goodhue, R. E., & Zalom, F. G. (2010). Spotted wing drosophila: potential economic impact of a newly established pest. *Agricultural and Resource Economics Update*, 13(3), 5-8.
- Calkins, C. O., & Parker, A. G. (2005). Sterile insect quality. *Sterile insect technique: principles and practice in area-wide integrated pest management*, 269-296.
- de la Vega, G.J., Triñanes, F. & González, A. Effect of *Drosophila suzukii* on Blueberry VOCs: Chemical Cues for a Pupal Parasitoid, *Trichopria anastrephae*. *J Chem Ecol* 47, 1014–1024 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10886-021-01294-7>
- Dreves, A. J., Cave, A., & Lee, J. C. T. (2014). A detailed guide for testing fruit for the presence of spotted wing drosophila (SWD) larvae.
- González, G., Mary, A. L., & Goñi, B. (2015). *Drosophila suzukii* (Matsumura) found in Uruguay. *Drosoph Inf Serv*, 98, 103-107.
- Gress, B. E., & Zalom, F. G. (2019). Identification and risk assessment of spinosad resistance in a California population of *Drosophila suzukii*. *Pest management science*, 75(5), 1270-1276.
- Ehler, L. E. (2006). Integrated pest management (IPM): definition, historical development and implementation, and the other IPM. *Pest management science*, 62(9), 787-789.
- Homem, R. A., Mateos-Fierro, Z., Jones, R., Gilbert, D., Mckemey, A. R., Slade, G., & Fountain, M. T. (2022). Field suppression of spotted wing drosophila (SWD) (*Drosophila suzukii* Matsumura) using the sterile insect technique (SIT). *Insects*, 13(4), 328.
- Knipling, E. F. (1955). Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *Journal of Economic Entomology*, 48(4), 459-462.
- Lanouette, G., Brodeur, J., Fournier, F., Martel, V., Vreysen, M., Cáceres, C., & Firtlej, A. (2017). The sterile insect technique for the management of the spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii*: establishing the optimum irradiation dose. *Plos one*, 12(9), e0180821.
- Lauyé, A. L. M. (2017). Diversidad de Drosophilidae (Diptera) en frutos de interés productivo y agronómico, en localidades de la región sur de Uruguay, con especial atención a la especie invasora *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931).
- Lee, J. C., Wang, X., Daane, K. M., Hoelmer, K. A., Isaacs, R., Sial, A. A., & Walton, V. M. (2019). Biological control of spotted-wing *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae)—current and pending tactics. *Journal of Integrated Pest Management*, 10(1), 13.
- Triñanes, F., de la Vega, G., González, A. Behavioral and olfactory responses of drosophilid parasitoids to SWD-infested fruit volatiles. (2022a) Pherofruits: IOBC/WPRS Joint Meeting of Working Groups “Pheromones and other semiochemicals in integrated production” and “Integrated Protection of Fruit Crops”. Girona, España, 2022.
- Triñanes, F., González, A, de la Vega, G. Olfactory responses of *Drosophila suzukii* parasitoids to chemical cues from SWD-infested fruit. (2022b) *BioRxiv* 2022.09.08.507209; doi: <https://doi.org/10.1101/2022.09.08.507209>.
- Walsh, D. B., Bolda, M. P., Goodhue, R. E., Dreves, A. J., Lee, J., Bruck, D. J., ... & Zalom, F. G. (2011). *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): invasive pest of ripening soft fruit expanding its geographic range and damage potential. *Journal of Integrated Pest Management*, 2(1), G1-G7.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)

