



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Tesina de grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas,
Orientación en Ecología
Facultad de Ciencias, Universidad de la República

**Caracterización comportamental del parasitoide
Trichopria anastrephae (Hymenoptera: Diapriidae),
potencial controlador de la mosca plaga
Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae)
en Uruguay**

Federico Triñanes

Tutor: Dr. Gerardo de la Vega¹

Co-orientador: Dr. Andrés González Ritzel¹

Tribunal evaluador: Dra. Beatriz Goñi² y Dr. Ciro Invernizzi³

¹ Laboratorio de Ecología Química, Facultad de Química, Universidad de la República.

² Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

³ Sección Etología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

1 Resumen

La mosca de alas manchadas, *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera: Drosophilidae), es una especie invasora estudiada por su impacto sobre frutos de piel fina a nivel mundial, entre ellos los arándanos (*Vaccinium* spp.). Desde una perspectiva del Manejo Integrado de Plagas, uno de los métodos de control que se estudian para esta mosca es el control biológico por parte de insectos parasitoides. La avispa *Trichopria anastrephae* (Costa Lima, 1940) (Hymenoptera: Diapriidae) es un endoparasitoide de pupa generalista presente a nivel regional, con capacidad para desarrollarse sobre *D. suzukii*. Ante el arribo de una especie invasora a una nueva región se establecen interacciones novedosas en las redes tróficas locales. Controladores naturales locales como los parasitoides deberán discernir, potencialmente mediante claves químicas volátiles, la posición precisa de un nuevo potencial hospedero. En este marco, esta tesina estudia el rol de semioquímicos volátiles en la búsqueda de hospederos por parte del parasitoide *T. anastrephae*, específicamente para el caso de fruta infestada por *D. suzukii*. El trabajo evalúa la respuesta de hembras adultas de *T. anastrephae* en dispositivos de olfatometría (tubo en Y) a compuestos volátiles resultantes del desarrollo de *D. suzukii* sobre arándanos (10 días post-oviposición), en función de la primera y última elección en la búsqueda de hospederos, y tiempo de permanencia de la avispa en cada sección del dispositivo. A su vez, siendo que los ritmos biológicos pueden tener consecuencias en la eficiencia de estrategias de control biológico, estos parámetros comportamentales fueron analizados en relación al horario del día. Los resultados obtenidos muestran que los olores procedentes de arándanos atacados por *D. suzukii* son detectados y preferidos por hembras de *T. anastrephae*. La respuesta del parasitoide es máxima al comparar los arándanos atacados frente a aire limpio, mientras que se ve disminuida cuando se disponen arándanos sin atacar a modo de control, posiblemente como resultado de la interferencia entre olores. La preferencia de *T. anastrephae* por arándanos atacados presentó un patrón horario con valores máximos hacia la mañana y la tarde, y una disminución de la respuesta hacia horas centrales del día. El conocimiento de la fluctuación diaria del comportamiento de búsqueda de hospederos puede aportar información útil hacia una eventual estrategia de manejo de *D. suzukii* en la que *T. anastrephae* sea el controlador biológico.

Palabras clave: *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae), parasitoides, *Trichopria anastrephae* (Hymenoptera: Diapriidae), búsqueda de hospederos, semioquímicos, control biológico, variación circadiana.

2 Agradecimientos

A los responsables del Laboratorio de Ecología Química, Carmen Rossini y Andrés González, por permitirme conocer ese extraordinario lugar, donde grandes valores de personas, a quienes extendiendo mi agradecimiento, versan temas tan interesantes y hacen que el laboratorio sea tal; un gran lugar para aprender y crecer.

Agradecido por la generosidad de los tutores, Gerardo de la Vega y Andrés González, cuya obvia asimetría nunca pusieron en evidencia. Gracias por impulsarme a superar un año de desafíos y cumplir objetivos que inicialmente parecían tan lejanos y por momentos escaparse. Por guiarme en esta etapa de tanto aprendizaje y crecimiento, y por la apuesta a que simplemente sea un comienzo.

Agradezco especialmente a Gerardo, a quien difícilmente le pueda expresar mi agradecimiento y su significado en resumidas frases. Responsable de que cada día sea pleno disfrute. Gracias por aproximarme a los quehaceres de la investigación y por transmitir tanto; conocimiento, confianza y serenidad, por tanta alegría.

Gracias a los integrantes del tribunal, Beatriz Goñi y Ciro Invernizzi, por aceptar evaluar el trabajo en los tiempos que corren, por el tiempo dedicado y su rápida devolución, con valiosos comentarios y correcciones que elevaron la calidad del trabajo.

Por último, agradecer a todas las personas que me han acompañado y compartido conmigo en el recorrido hasta esta etapa de la vida. Familiares, amigos y compañeros, indudables artífices de este logro alcanzado.

¡Muchas gracias!

Contenido

1	Resumen	2
2	Agradecimientos	3
3	Introducción.....	7
3.1	Interacción planta-insecto.....	7
3.2	Interacciones tri-tróficas	8
3.3	Especies exóticas invasoras	9
3.3.1	<i>Drosophila suzukii</i> (Diptera: Drosophilidae).....	10
3.4	Parasitoides	15
3.4.1	<i>Trichopria anastrephae</i> (Hymenoptera: Diapriidae)	16
3.4.2	Búsqueda de hospederos por parte de parasitoides	19
3.5	Semioquímicos	20
3.6	Arándanos; <i>Vaccinium</i> spp. (Ericales: Ericaceae).....	22
3.7	Métodos de control de <i>Drosophila suzukii</i>	24
3.8	Manejo Integrado de Plagas.....	25
3.8.1	Control biológico	26
3.9	Ritmo biológico del comportamiento.....	29
4	Objetivos.....	30
4.1	Objetivo general	30
4.2	Objetivos específicos	30
5	Materiales y Métodos	31
5.1	Insectos	31
5.2	Dispositivo experimental	31
5.3	Estímulos	32
5.4	Procedimiento experimental	33
5.5	Análisis estadístico	34
6	Resultados	35
6.1	Detección y atracción a los estímulos.....	36
6.2	Respuestas en función del horario	39
7	Discusión	44
8	Perspectivas	48
9	Anexo	49

9.1	Consideraciones sobre el dispositivo de olfatometría (Tubo en Y).....	49
9.2	Performance de <i>Trichopria anastrephae</i> sobre <i>Drosophila suzukii</i>	50
9.3	Método de cría de parasitoides microhimenópteros	51
10	Bibliografía.....	54

Índice de figuras

Figura. 1. Macho adulto de <i>Drosophila suzukii</i>	10
Figura. 2. Hembra adulta de <i>Drosophila suzukii</i>	11
Figura. 3. Daño sobre la fruta provocado por <i>Drosophila suzukii</i>	11
Figura. 4. Distribución geográfica de <i>Drosophila suzukii</i>	14
Figura. 5. Adultos de <i>Trichopria anastrephae</i> (ambos sexos)	17
Figura. 6. Distribución geográfica de <i>Trichopria anastrephae</i>	17
Figura. 7. Oviposición de <i>Trichopria anastrephae</i> sobre <i>Drosophila suzukii</i>	18
Figura. 8. Ciclos de vida de <i>Drosophila suzukii</i> y <i>Trichopria anastrephae</i>	28
Figura. 9. Dispositivo de olfatometría	32
Figura. 10. Impacto de <i>Drosophila suzukii</i> sobre los arándanos	33
Figura. 11. Réplicas analizadas respecto al total (evaluación de la metodología)	35
Figura. 12. Primera elección en olfatómetro	36
Figura. 13. Tiempo de permanencia promedio en cada brazo del olfatómetro	37
Figura. 14. Posición final en olfatómetro	38
Figura. 15. Primera elección en función del horario	39
Figura. 16. Tiempo de permanencia promedio en función del horario	40
Figura. 17. Posición final en función del horario	41
Figura. 18. Índice de preferencia a lo largo del día	42
Figura. 19. Esquema del procedimiento de cría de microhimenópteros	53

3 Introducción

3.1 Interacción planta-insecto

La relación planta-insecto, inmersa en contextos dinámicos a nivel espacial y temporal (Meiners, 2015), representa la interacción biótica dominante en la naturaleza y es central en la mayoría de los ecosistemas terrestres (Seastedt & Crossley, 1984; Weisser & Siemann, 2008). Las plantas realizan la transducción de energía no asequible para los animales y la disponen para los niveles tróficos superiores, estableciendo la base de la estructuración trófica y el sentido del flujo energético. Por su parte, los insectos son la clase más representativa de los artrópodos y el grupo de organismos que exhiben mayor diversidad del reino animal. En esta clase, una fracción considerable de especies y la más diversa son fitófagas (Schoonhoven et al., 2005). Las plantas y los insectos herbívoros han establecido una estrecha relación a lo largo de una historia co-evolutiva que asciende los 350 millones de años (Labandeira, 1993). Su incidencia recíproca a través del tiempo ha moldeado aspectos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos de ambos grupos de forma tal de contrarrestar las estrategias de vulneración, repercutiendo a niveles biológicos superiores; poblacionales, comunitarios y ecosistémicos (Gatehouse, 2002; Carmona et al., 2015).

Lo conspicuo de las plantas y la imposibilidad de evadir la predación a través de una respuesta comportamental resulta en estrategias defensivas contra herbívoros particulares, directas e indirectas, constitutivas o inducibles. Las plantas pueden afectar directamente la herbivoría a través de estructuras de protección mecánica superficiales o la producción de compuestos tóxicos. A su vez, la atracción de enemigos naturales mediante compuestos volátiles o recompensas nutricionales es un mecanismo indirecto de defensa contra herbívoros (War et al., 2012).

Los insectos herbívoros son el grupo más representativo en términos de riqueza y abundancia (Stork, 2018), al igual que dentro de la categorización antrópica de especies plaga (Dent & Binks, 2020). Al utilizar como fuente energética el nivel trófico básico, y con la posibilidad de explotar un mismo recurso de distintos modos a través de especializados hábitos de alimentación, los insectos herbívoros disponen potencialmente de una gran cantidad de recursos (Herrera & Pellmyr, 2002). En este sentido, los sistemas agrícolas representan una fuente abundante de recursos. Históricamente, debido a las consecuencias ecológicas y económicas de las especies plaga, la interacción entre dichos niveles tróficos ha suscitado el interés de investigadores, principalmente por la amenaza que significan para la producción alimentaria (Oerke, 2006; Cook et al., 2011).

3.2 Interacciones tri-tróficas

El enfoque de dos niveles de la interacción planta-insecto proporciona una visión parcial de las comunidades terrestres, las cuales presentan de dos a cinco niveles tróficos y típicamente se componen de tres niveles (Begon et al., 1986). Los seres vivos evolucionaron y son funcionales en contextos multi-tróficos. Una comprensión más completa de las interacciones planta-insecto requiere la consideración de al menos un nivel adicional; las plantas, los herbívoros asociados a éstas y sus enemigos naturales (Price et al., 1980; Schoener, 1989). Los enemigos naturales (parasitoides y depredadores) son considerados fauna benéfica por reducir la presión de los herbívoros sobre el primer nivel trófico en los sistemas naturales, y explica su interés como controladores biológicos aplicado a sistemas agrícolas valiéndose de la interacción ecológica preexistente. El control de especies plagas es entendido como uno de los principales servicios ecosistémicos que brinda la fauna benéfica (Losey & Vaughan, 2006; Power, 2010). Desde esta perspectiva, los enemigos naturales pueden ser considerados parte del sistema defensivo de las plantas y, en ciertos casos, favorecer el éxito reproductivo de las mismas (van Loon et al., 2000). A su vez, el tercer nivel no está exento de sus propios enemigos naturales. Los hiperparasitoides son insectos que utilizan como hospederos a los parasitoides y reducen su capacidad de control de plagas, adicionando un nivel trófico y complejidad a las interacciones.

La divergencia evolutiva entre los niveles tróficos no desliga las codependencias ecológicas entre las especies que interactúan. Muchos rasgos fisiológicos, ecológicos y comportamentales están influenciados por interacciones (directa o indirectamente) con organismos de otros niveles tróficos consecuencia de la historia evolutiva compartida (Carmona et al., 2015). Las presiones reguladoras entre los niveles son bidireccionales, y efectos en cascada permite que repercutan indirectamente sobre toda la cadena trófica (Vandermeer et al., 1985; Strauss, 1991; Hunter & Price, 1992; Dicke & Baldwin, 2010). En las interacciones tri-tróficas (planta-herbívoro-parasitoide) los niveles tróficos inferiores pueden influir sobre la fisiología y el comportamiento de los parasitoides, y las plantas tienen particular importancia en el nexo de la interacción a través de la información química (Price et al., 1980; Heil, 2008; Felton & Tumlinson, 2008).

El estudio sobre interacciones tri-tróficas que involucra herbívoros exóticos es escaso (White et al., 2006; Gandhi & Herms, 2010). El presente estudio se centra en un sistema biológico novedoso que involucra tres niveles tróficos, un cultivo establecido (*Vaccinium* spp.; Ericales: Ericaceae), una especie herbívora invasora (*Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera: Drosophilidae)), y un potencial enemigo natural residente de la región (*Trichopria anastrephae* (Costa Lima, 1940) (Hymenoptera: Diapriidae)).

3.3 Especies exóticas invasoras

Dentro de las interacciones biológicas, el estudio de las especies exóticas invasoras plaga forman un grupo de gran importancia. Estas especies son aquellas con propensión a expandir su rango de distribución nativo extendiéndose sobre una nueva región, y se consideran uno de los factores promotores de pérdida de biodiversidad (Wilcove et al., 1998; Didham et al., 2005). Dicho impacto ecológico se produce a varios niveles; genéticos, individuales, poblacionales, comunitarios, afectando los procesos ecosistémicos a escalas espaciales variables (Williamson, 1996; Parker et al., 1999). Al invadir un nuevo ambiente, las especies exóticas interactúan con las especies nativas, estableciendo nuevas interacciones tróficas (Verhoeven et al., 2009; Harvey et al., 2010) e interfiriendo sobre las interacciones preexistentes (White et al., 2006). Las especies invasoras pueden afectar a la biodiversidad a través de interacciones directas como ser la explotación de la vegetación establecida del nuevo ambiente y así alterar indirectamente la composición comunitaria (Kenis et al., 2009; Gandhi & Herms, 2010). Este efecto ecológico generalmente resulta en pérdidas económicas cuando la presión de especies herbívoras invasoras actúa sobre variedades de plantas cultivables en la región invadida (Paini et al., 2016).

El establecimiento de una especie invasora se puede ver restringido tanto por las condiciones ambientales, la habilidad para competir con especies locales, como por su susceptibilidad a ser presa u hospedero de enemigos naturales nativos o establecidos (Schönrogge et al., 2012). De lo contrario, podría ser un indicador de la ausencia de enemigos naturales o la ineficiencia de éstos en controlar la nueva especie invasora. De hecho, múltiples hipótesis propuestas para explicar el éxito de las especies invasoras son atribuidas directa o indirectamente al efecto de los enemigos naturales (Jeschke & Heger, 2018). La colonización de un ambiente libre de los enemigos naturales habitantes en su región de origen supone para la especie invasora una ventaja inmediata al ocupar un nicho disponible desprovisto de la presión ejercida por el nivel trófico superior.

A pesar de que enemigos naturales locales puedan imponer una limitación a la dispersión de una especie invasora, la utilización de hospederos o depredación de herbívoros exóticos puede tener consecuencias a nivel de la comunidad local por el establecimiento de esta nueva asociación puesto que se reduce el control de los hospederos o presas habituales (Timms et al., 2012).

La invasión de especies ha estado estrechamente ligada a las actividades antrópicas y ha sido potenciada por la globalización de los tiempos modernos. El intercambio de productos agrícolas es una de las principales vías de dispersión de especies asociadas a tales cultivos (Lantschner et al., 2019; de la Vega et al., 2020). Una especie que ha adquirido gran relevancia en las últimas décadas por su capacidad invasiva e incidencia sobre la producción de frutas de piel fina a nivel

mundial es la mosca de alas manchadas, *D. suzukii*. Además de la propagación de la especie a escalas menores dada por la capacidad autónoma de dispersión de los adultos en busca de hospederos para el desarrollo larval, la rápida dispersión a escalas mayores fue facilitada por la comercialización de fruta fresca a nivel global y la falta inicial de regulación sobre la propagación de especies *Drosophila* (CABI, 2020).

3.3.1 *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae)

La mosca de alas manchadas, *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera: Drosophilidae), pertenece al sub-género *Sophopora* y dentro del grupo *melanogaster* integra el sub-grupo *suzukii*. El primer reporte de esta especie data de 1916 en Japón, donde inicialmente fue identificada como una especie de *Drosophila* y posteriormente (1931) fue descrita por Shounen Matsumura como *Drosophila suzukii*.

Los machos adultos miden aproximadamente 2 a 3.5 mm de largo (Fig. 1a), mientras que las hembras son generalmente de mayor dimensión, de 2.25 a 4 mm (Fig. 2a). Poseen ojos rojos, antenas aristadas, tórax marrón-amarillento pálido y bandas transversales oscuras en el abdomen. La especie presenta evidentes caracteres sexuales dimórficos que permiten identificar el sexo fácilmente. El rasgo más distintivo, no exclusivo dentro del género, son las manchas oscuras en la parte distal-lateral de las alas de los machos (Fig. 1a y b) (Takamori et al., 2006), las cuales pueden aparecer dos días después de la emergencia del individuo (Hauser, 2011). Además, los machos presentan peines oscuros (3 a 6 dientes cada uno) en el primer y segundo segmento tarsal de las patas anteriores dispuestos en hilera en la zona distal de cada segmento (Fig. 1c).

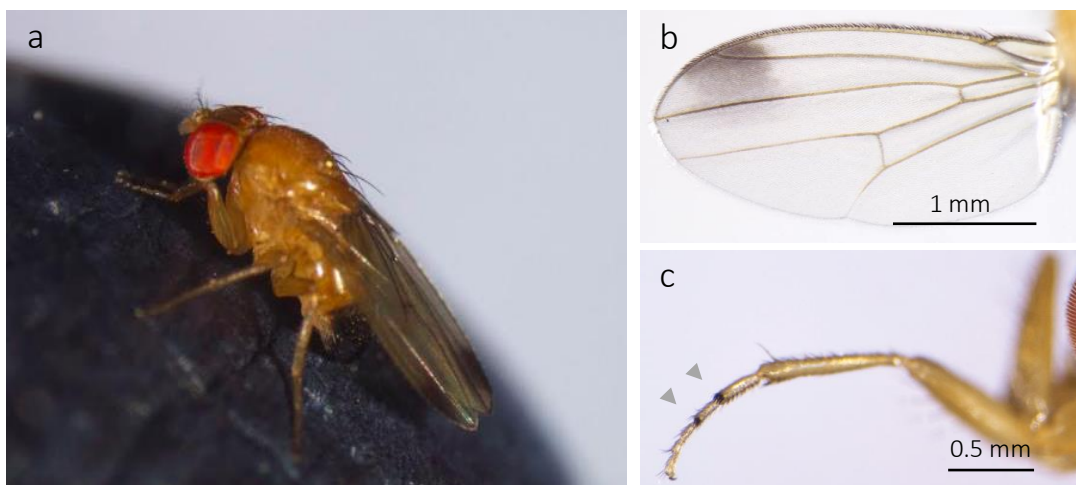


Figura 1. (a) Macho adulto de *Drosophila suzukii* sobre un arándano. (b) Mancha oscura en la parte distal-lateral de las alas y (c) peines tarsales en las patas anteriores, ambas características presentes solo en los machos.

Por su parte, las hembras presentan un ovipositor aserrado en el extremo abdominal (tampoco exclusivo dentro del género) con el que dañan la integridad de las frutas (Fig. 2b y Fig. 3a). El ovipositor presenta una doble hilera de dientes fuertemente esclerotizados (Fig. 2b) que les permite perforar el epicarpio de diversos frutos y depositar los huevos en su interior, al resguardo de las inclemencias climáticas, de agentes biológicos y químicos (Fig. 3b y [Video del proceso de oviposición de *D. suzukii*](#)).

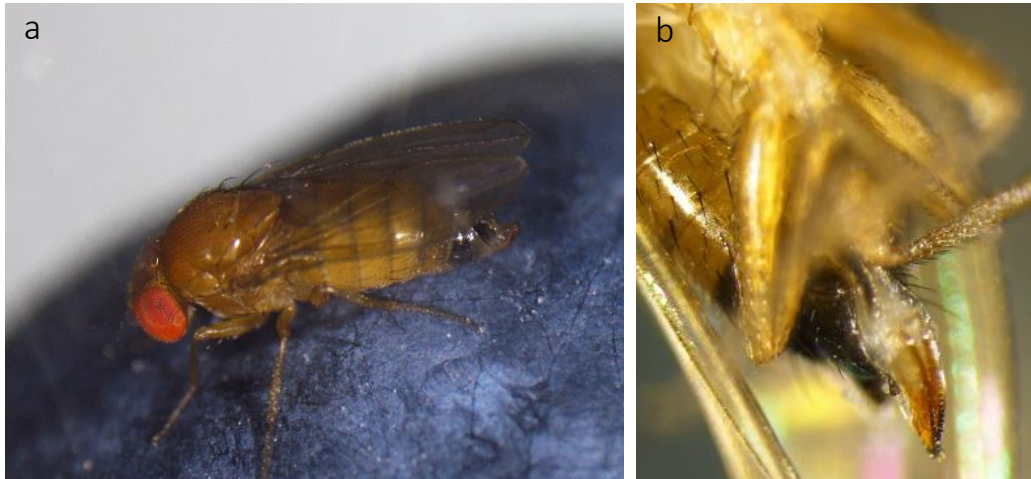


Figura 2. (a) Hembra adulta de *Drosophila suzukii*. (b) Detalle del ovipositor aserrado y esclerotizado en el extremo abdominal característico de la especie.



Figura 3. (a) Hembra adulta de *Drosophila suzukii* perforando la piel de un arándano con su ovipositor, previo a la deposición del huevo en el interior del fruto. (b) Filamentos de los huevos sobresaliendo del fruto.

El desarrollo de *D. suzukii* muestra que es una especie sumamente prolífica con breves tiempos generacionales. La tasa de desarrollo es más rápida a una temperatura constante de 28 °C, tardando 10 días el ciclo de huevo a adulto; 6 días de huevo a pupa y 4 de pupa a adulto en arándanos (Kanzawa, 1939; Lee et al., 2011b; Tochen et al., 2014). El período de pre-oviposición oscila de uno a tres días y puede alcanzar los 25 huevos diarios en medios artificiales (Kinjo et al., 2014). El número de generaciones anuales puede ascender a más de 13 (Kanzawa, 1939; Tochen et al., 2014). Los huevos, ovalados de color blanco brillante (aproximadamente 0.5 mm de largo), son depositados en el interior de los frutos y los dos filamentos respiratorios que presentan en uno de los extremos sobresalen de la piel del fruto (Fig. 3b). Antes de las 24 horas post-deposición, eclosiona una larva vermiforme de color blanco y sin cabeza definida, la cual desarrollará en los siguientes estadios larvales mandíbulas formadas por dos ganchos bucales esclerotizados de color oscuro que se mueven verticalmente, con los que se alimentan y dañan el interior de la fruta. Presentan tres estadios larvales morfológicamente semejantes previo a empupar, excepto por el incremento de tamaño a medida que avanza el desarrollo, alcanzando dimensiones de 5.5 mm de largo y 0.8 mm de ancho. Tras un periodo de alimentación y crecimiento de la larva, la transición del estadio inmaduro áptero a la etapa adulta alada transcurre a través de una etapa de pupa típica de los insectos holometábolos. El sitio para empupar de *D. suzukii* puede ser tanto en el fruto en que se desarrolló el estadio larval como en el sustrato adyacente (Kanzawa, 1939), observándose que lo hace preferentemente en el suelo inmediato (Woltz & Lee, 2017). La pupa (coarctata), al igual que otras *Drosophila*, queda encerrada en una cubierta de cutícula rígida de color marrón-rojizo de dimensiones aproximadas de 3.5 mm de longitud y 1.2 mm de ancho, dentro de la que se desarrollará hasta alcanzar el estado adulto. Presenta dos proyecciones filamentosas (espiráculos) en el extremo anterior y dos espiráculos en el extremo posterior. Los espiráculos respiratorios consisten en una proyección con ramificaciones (7 ramas largas y 2 cortas) y permiten la identificación de la especie. Luego de cuatro o cinco días de pupación emerge el adulto que a los tres días alcanzará la madurez sexual para dar continuidad al ciclo de la mosca (Fig. 8).

En el modo de desarrollo y su hábito polífago radica la relevancia agronómica de la especie. Su impacto se observa sobre la producción de una amplia variedad de frutos pequeños de piel fina en distintas regiones del mundo, principalmente de arándanos, frutillas y frambuesas, estimándose reducciones en rendimiento entre el 20 y 80% según el tipo de cultivo (Bolda et al., 2010; Goodhue et al., 2011). El desarrollo de los estadios larvales deteriora directamente el interior del fruto hospedero (Kanzawa, 1939). Además del daño causado por el estadio larval, la perforación del epicarpio que resulta de la oviposición permite que proliferen patógenos secundarios como hongos y bacterias, contribuyendo y acelerando el proceso de deterioro de la fruta (De Camargo & Phaff,

1957; Cini et al., 2012) (Fig. 10). A diferencia de otras *Drosophila*, *D. suzukii* tiene la capacidad de oviponer tanto en frutos en buen estado (comercializables) como en frutos dañados y sobre-maduros (Sasaki & Sato, 1995, 1996), siendo preferidos los frutos en proceso de maduración respecto a los sobre-maduros (Lee et al., 2011a; Atallah et al., 2014). La versatilidad en cuanto al estado de preferencia de su hospedero les confiere una ventaja competitiva ante otras especies de *Drosophila* (Cini et al., 2012), estableciéndose una segregación temporal en la colonización de un recurso que es compartido. Mientras *D. suzukii* muestra preferencia por frutos en estados no sobre-maduros para el desarrollo larval (Walsh et al., 2011), la mayoría de las *Drosophila* lo hace en fruta sobre-madura o en estado de descomposición (Atallah et al., 2014; Entling et al., 2019; Stewart et al., 2014). De este modo, *D. suzukii* se anticipa a sus congéneres y reduce la competencia interespecífica (Hardin et al., 2015; Jaramillo et al., 2015), facilitando el establecimiento de las condiciones proclives para la posterior colonización del recurso por otras especies de *Drosophila* u otros insectos (Rombaut et al., 2017; Shaw et al., 2018). A pesar de que pueda existir un desfase en términos de nicho, la segregación no es completa dado que ambas especies co-ocurren y comparten especies hospederas para su desarrollo, tanto cultivadas como silvestres (Kenis et al., 2016; Lee et al., 2015; Wang et al., 2016; Santoiemma et al., 2019; Tait et al., 2020). A su vez, *D. suzukii* también tiene la posibilidad de oviponer en fruta en estado de descomposición, especialmente durante períodos en los que es limitada la disponibilidad de los frutos maduros de preferencia (Bal et al., 2017; Silva-Soares et al., 2017; Santoiemma et al., 2020), amplificando el número de hospederos que dispone la especie para desarrollarse.

La temperatura es un parámetro determinante de la actividad, tiempos de desarrollo, fecundidad y la supervivencia de los organismos poiquiloterms y condicionantes del alcance de su distribución geográfica. La tolerancia térmica es una de las características que explica el establecimiento de *D. suzukii* a distintas latitudes. Los adultos exhiben morfotipos estacionales (de invierno y verano) que le permite ampliar el rango de tolerancia térmica y adecuarse a condiciones ambientales más extremas. Los adultos son más activos a temperaturas entre 15-20 °C (Kanzawa, 1939; Hamby et al., 2013). Sin embargo, también toleran temperaturas extremadamente bajas (Sasaki & Sato, 1995; Mitsui et al., 2010).

Además de ser una especie muy prolífica con tiempos generacionales acotados, su amplia tolerancia a condiciones ambientales, su habilidad competitiva y su hábito polífago permiten pronosticar un aumento de su distribución geográfica, convirtiéndola en una especie invasora por excelencia. Inicialmente distribuida en el sudeste asiático (China, Japón y Korea) (Walsh et al., 2011), el primer registro fuera de su rango de distribución nativo fue en Hawaii en 1980 (CABI,

2020). En las últimas décadas expandió drásticamente su distribución y actualmente alcanza a la totalidad de Europa, el norte africano y América (Fig. 4). Calabria y colaboradores (2012) estimaron que la expansión de distribución de la especie se podría producir a razón de 1400 kilómetros por año. La tasa de dispersión y su impacto representan una importante preocupación para la producción frutícola a nivel global. En 2008 fue reportada simultáneamente en Europa (España e Italia) y en el oeste de Estados Unidos, donde han sido registrados considerables daños sobre la producción frutícola, especialmente sobre cultivos de arándanos, frutillas y cerezas (Bolda et al., 2010; Walsh et al., 2011). La dispersión dentro de los respectivos continentes se produjo inmediatamente tras su detección. Su presencia al sur de la región neotropical es más reciente, en Brasil fue detectada entre 2012-2013 (Deprá et al., 2014), en 2014 en Argentina (Santadino et al., 2015, de la Vega et al., 2020) simultáneamente con Uruguay (González et al., 2015) y más tardíamente en Chile entre 2015-2017 (Medina-Muñoz et al., 2015). En Uruguay fue reportada en cultivos de arándanos en la región centro-sur del país (González et al., 2015). Además, se detectó la presencia de *D. suzukii* en una gran variedad de cultivos (arándanos, arazá amarillo, arazá rojo, guayabo del país, caqui, higo, naranja, uvas, frambuesa, zarzamoras, ciruelas y peras) al sur de Uruguay, en los departamentos de Montevideo, Canelones, Maldonado y San José (Lauyó, 2017). Si bien ha sido reportada en algunos departamentos, en base a modelos de distribución potencial de *D. suzukii* que consideran las características de la especie y las condiciones ambientales, se ha propuesto que su presencia podría extenderse a la totalidad del país (Benito et al., 2016; dos Santos et al., 2017; Andreazza et al., 2017).

Figura 4. Distribución de *Drosophila suzukii* a nivel global a la actualidad (2020). Se indican los países que han reportado la presencia de la especie, sea distribuida en la totalidad del país o reportes localizados. Información tomada de los artículos citados en el trabajo.

3.4 Parasitoides

Los parasitoides, en su mayoría pertenecientes a los órdenes Diptera e Hymenoptera, son los principales enemigos naturales de los herbívoros invertebrados (Price, 1984). Son un grupo de insectos que tienen vida libre de adultos, aunque son dependientes de otro artrópodo para completar su ciclo de vida. El desarrollo larval se produce sobre o dentro de su hospedero, al cual a diferencia de un verdadero parásito, indefectiblemente termina matando. Dado que todos los estadios del desarrollo de los insectos son susceptibles al ataque de parasitoides, estos tienen un efecto regulatorio sobre poblaciones de otros artrópodos (Hawkins et al., 1997; Hassell, 2000; Letourneau et al., 2009). Se los puede clasificar de acuerdo al momento en que matan a su hospedero en idiobiontes (si lo hacen inmediatamente) o coinobiontes (una vez avanzado el desarrollo). Un ciclo básico de los parasitoides consiste en la puesta de los huevos en el interior (o exterior) de algún estadio del desarrollo del insecto hospedero, en general en estados inmaduros (huevo, larva o pupa) y con alta especificidad, con el posterior desarrollo de la larva del parasitoide dentro (o sobre) del hospedero. El hospedero normalmente muere una vez que las larvas empupan y, al alcanzar el estadio adulto, el parasitoide emerge de su hospedero (muerto) y regresa al estado de vida libre (Fig. 8). La muerte del hospedero durante el desarrollo del parasitoide explica su potencial uso de los parasitoides como agentes de control biológico (Eggerton & Belshaw, 1992; Godfray, 1994; Quicke, 1997). Su utilización para controlar insectos plaga en la agricultura es de larga data (Greathead, 1986). Por dicha razón, muchos trabajos sobre parasitoides se han centrado en cómo reducen los niveles poblacionales de sus hospederos directamente a través de la mortalidad y las consecuencias sobre las dinámicas poblacionales de ambos insectos involucrados (parasitoides y hospederos). Sin embargo, también pueden producir efectos indirectos no letales sobre los hospederos, alterando su comportamiento o su desempeño (Abram et al., 2016; Kaser et al., 2018).

La tendencia hacia prácticas más ecológicas aplicada a los sistemas agrícolas de las últimas décadas ha impulsado investigaciones sobre enemigos naturales. La preocupación generada por *D. suzukii* a nivel mundial, ha potenciado el estudio de parasitoides del género *Drosophila* en su región de origen y en algunas de las regiones invadidas. Aproximadamente 50 especies de himenópteros parasitan y ejercen una importante regulación de especies de *Drosophila*, pertenecientes a cuatro familias (al menos 16 géneros reconocidos) (Carton et al., 1986). La mayoría son parasitoides de larvas del género *Asobara* (Braconidae), *Leptopilina* y *Ganaspis* (Figitidae). Otros son de pupa, pertenecientes al género *Pachycrepoideus* (Pteromalidae) y *Trichopria* (Diapriidae). Diversas especies de los géneros mencionados anteriormente han sido

descriptas en asociación con *D. suzukii* en la región nativa de la especie (Daane et al., 2016; Giorgini et al., 2019). Cada especie de parasitoide presenta un grado de especificidad y eficiencia para desarrollarse en un hospedero particular. Algunos parasitoides pueden atacar indistintamente hospederos relacionados filogenéticamente que comparten propiedades fisiológicas y mecanismos de defensa similares (Biondi et al., 2020). La ausencia de parasitoides eficientes contra *D. suzukii* en muchas de las regiones invadidas han dirigido el estudio hacia aquellas especies que comparten una historia evolutiva. La adaptación de parasitoides nativos al nuevo hospedero podría resultar en candidatos más eficientes para controlar la especie (Daane et al., 2016). La información disponible sobre parasitoides himenópteros nativos de la región neotropical está basada mayormente en parasitoides de dípteros tefrítidos (Ovruski et al., 2000). Los trabajos sobre parasitoides de especies de drosófilidos en la región son más escasos. En Uruguay, los parasitoides son un grupo de insectos poco estudiados y no se dispone de un relevamiento exhaustivo de las especies presentes.

3.4.1 *Trichopria anastrephae* (Hymenoptera: Diapriidae)

El parasitoide *Trichopria anastrephae* (Costa Lima, 1940) (Hymenoptera: Diapriidae) pertenece a la familia Diapriidae y a la subfamilia Diapriinae. Diapriidae es una de las mayores familias de himenópteros, representada por microhimenópteros pertenecientes a 197 géneros, 79 presentes en la región neotropical con 2300 especies descriptas. Se estima que el número de especies a nivel mundial asciende a 4000 (Arias-Penna, 2003; Masner, 2006). Tradicionalmente fue incluida en la superfamilia “Proctotrupeoidea”, actualmente fue asignada a la superfamilia Diaprioidea (Sharkey, 2007). El género *Trichopria* incluye microhimenópteros parasitoides idiobiontes de pupa, de los cuales muchas especies utilizan como hospedero estados inmaduros del orden Diptera, excepto algunas especies registradas como hiperparasitoides (Huggert & Masner, 1983) o aquellas que parasitan especies de hormigas (Loiácono et al., 2013).

La descripción inicial de la especie *T. anastrephae* fue realizada por Costa Lima en 1940, a partir de estadios inmaduros (pupas) de *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) de Río de Janeiro, Brasil. Esta avispa mide 2 mm y tiene un evidente dimorfismo sexual en sus antenas, siendo de mayor longitud y más pilosas en los machos. Este parasitoide es un endoparásito de pupa (Ovruski et al., 2000; Corseuil & Garcia, 2004; Cruz et al., 2011) –deposita los huevos en el hemocel de sus hospederos– (Fig. 7) y su desarrollo en el interior del hospedero generalmente resulta en la emergencia de un único adulto (Ioriatti, 1995). La duración del ciclo biológico (huevo-adulto)

promedio de los machos es de 19 días y 22 días para las hembras bajo las siguientes condiciones: temperatura $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$; humedad relativa $70 \pm 10\%$; fotoperiodo 12:12) (Krüger et al., 2019) (Fig. 8).

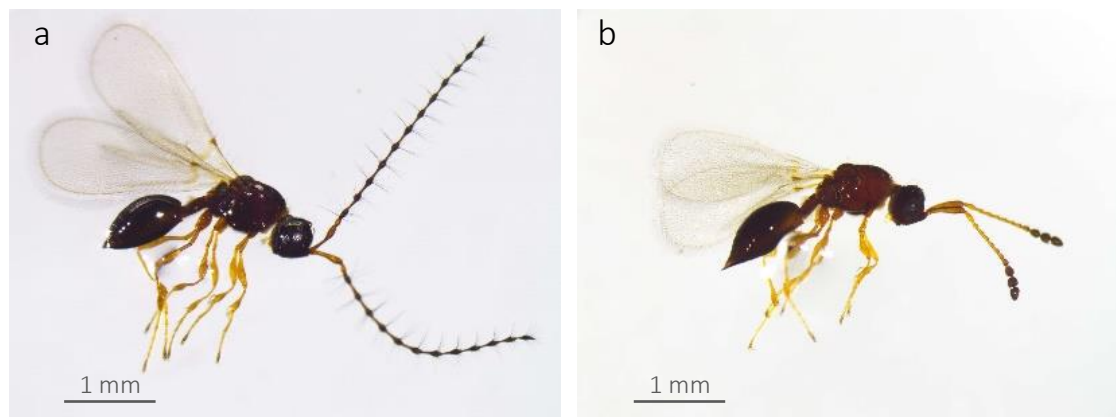


Figura 5. Adultos de *Trichopria anastrephae*; (a) macho y (b) hembra.

Los reportes sobre la presencia de la especie se concentran en la región neotropical (Fig. 6). En Brasil, *T. anastrephae* se ha registrado en estados de la zona centro sur-sudeste de Brasil; Río de Janeiro (Lima, 1940; De Santis, 1980; Aguiar-Menezes et al., 2001), Minas Gerais (Silva et al., 2003), Goiás (Marchiori & Penteado-Dias, 2001), Santa Catarina (Corseuil & Garcia, 2004) y Río Grande del Sur (Cruz et al., 2011). En Argentina fue reportada al noroeste del país en la provincia de Tucumán (Ovruski et al., 2000, 2004) y en Venezuela en el estado de Aragua (Boscán & Godoy, 1996). Recientemente (2019), fue encontrado en el departamento de Montevideo, Uruguay (de la Vega com. pers.).



Figura 6. Países de América del Sur donde se ha registrado a *Trichopria anastrephae*; Brasil, Argentina, Venezuela y Uruguay.

Trichopria anastrephae es una especie generalista que se desarrolla en al menos dos familias de Diptera (Drosophilidae y Tephritidae). A pesar de que la mayoría de los registros de la especie han sido asociados con moscas del género *Anastrepha* (Tephritidae) (De Santis, 1980), algunos investigadores proponen que *T. anastrephae* estaría más asociado a Drosophilidae (Ovruski et al., 2000) y que se podría reproducir más fácilmente en pupas de *Drosophila* (Turica & Mallo, 1961). Por lo pronto, ésta especie demuestra versatilidad en cuanto a la preferencia por hospederos de Diptera. Esta característica es usual en parasitoides generalistas, los cuales pueden exhibir comportamientos de cambio de hospederos ante un hospedero alternativo más abundante para maximizar su reproducción (Murdoch, 1969; Jaworski et al., 2013).

En condiciones de laboratorio, así como en cultivos de frutilla y zarzamora, *T. anastrephae* ha demostrado capacidad para parasitar a *D. suzukii* (Wollmann et al., 2016; Andreazza et al., 2017; Vieira et al., 2020a y b). La cría experimental de *T. anastrephae* en el Laboratorio de Ecología Química (Facultad de Química) fue establecida en pupas de *Drosophila* spp. (*D. melanogaster* y *D. suzukii*) donde se desarrollaron satisfactoriamente (Fig. 8). Bajo condiciones controladas [22°C, 65% de RH, 12:12 L:D] completan su ciclo en aproximadamente 20 días (Anexo 9.2 y 9.3).



Figura 7. Hembra de *Trichopria anastrephae* introduciendo su ovipositor en una pupa de *Drosophila suzukii* (ver [Video del proceso de oviposición de *T. anastrephae* sobre pupas de *D. suzukii*](#)).

3.4.2 Búsqueda de hospederos por parte de parasitoides

En búsqueda de pareja, alimento, hospedadores o refugios, los insectos deben ser capaces de diferenciar claves precisas dentro de un complejo mundo de estímulos de múltiples fuentes y de diversa naturaleza (Eisner & Meinwald, 1995; Schoonhoven et al., 2005). Los insectos son minúsculos componentes de un ambiente complejo y dinámico, donde la búsqueda y encuentro de hospederos óptimos (identidad y estadio) que permitan el desarrollo de los parasitoides están acotados temporalmente por los ciclos biológicos de las especies involucradas. Las presiones evolutivas contrapuestas sobre los distintos niveles tróficos suponen una complejidad adicional en el proceso de búsqueda de hospederos por los parasitoides. Los hospederos, poco conspicuos *per se*, buscan activamente pasar desapercibidos a través de diversas estrategias. En este contexto natural, la detección de claves provenientes del segundo nivel trófico pudo haber limitado la eficacia para encontrar hospederos por parte de enemigos naturales, por lo que la información proveniente de las plantas adquirió mayor relevancia en el proceso (Vet & Dicke, 1992).

La búsqueda de hospederos por parte de parasitoides es realizada por las hembras adultas. En general, acto seguido al encuentro de un hospedero prosigue la oviposición, por lo cual el éxito de la búsqueda es determinante en el éxito reproductivo de estos insectos. Dada la importancia del encuentro de hospederos adecuados y las dificultades que interceden en el proceso, la estrategia de búsqueda debería resultar ser más eficiente que una simple búsqueda aleatoria. En este sentido, las señales visuales y especialmente las claves olfatorias son importantes en la ubicación del hospedero y optimizan el comportamiento de búsqueda (Vinson, 1976). Además, la experiencia en diferentes estadios del desarrollo puede influir sobre el comportamiento de búsqueda a través de la asociación de estímulos y el reconocimiento condicionado de claves que revelan indirectamente la presencia de su hospedero (Turlings et al., 1993).

Diversos factores físicos o químicos intervienen sobre el proceso de selección de hospedero de los parasitoides. En este proceso, la información química parece tener un rol importante y de particular importancia para los parasitoides himenópteros (Vinson, 1976). La mayoría de los receptores olfativos de los insectos que permiten la detección de la información química de alta sensibilidad, con umbrales de detección y discriminación muy pequeños se concentran en las antenas. Posiblemente, la alta sensibilidad sea resultado de interacciones intraespecíficas en las que las presiones selectivas son equiparables y la variación cualitativa de la señal es mínima (Masson & Mustaparta, 1990). Muchos compuestos volátiles, por sí mismos o en combinación con otros, son capaces de producir una sensación olfativa dependiente de la concentración de dichos compuestos.

3.5 Semioquímicos

Los compuestos químicos involucrados en las interacciones entre organismos son denominados semioquímicos (Law & Regnier, 1971). En base a las especies que interactúan, es decir, si la interacción es intraespecífica o interespecífica, los semioquímicos se clasifican en feromonas o aleloquímicos, respectivamente (Nordlund & Lewis, 1976). Además, dependiendo si la sustancia liberada beneficia al emisor, al receptor o a ambas partes, se denominan alomonas, kairomonas y sinomonas, respectivamente (Brown et al., 1970; Whittaker & Feeny, 1971; Nordlund & Lewis, 1976). El concepto de aleloquímico incluye compuestos que actúan como claves químicas entre especies que permiten distinguir entre fuentes emisoras a partir de la capacidad asociativa del receptor. Una sutil distinción entre los términos clave y señal química es que estas últimas transmiten información más concisa y dirigida, mientras que las claves pueden ser potencialmente explotadas por cualquier organismo, sin ser necesariamente destinatario directo de la información. En las interacciones tri-tróficas (planta-herbívoro-parasitoide), los aleloquímicos pueden provenir del hospedero (segundo nivel trófico), la planta de la que se alimenta (primer nivel trófico), de otros organismos asociados al herbívoro (microorganismos) o de las interacciones entre los niveles anteriormente mencionados (Vet & Dicke, 1992; Godfray, 1994; Powell & Poppy, 2001). Tanto las plantas como los herbívoros son fuentes odoríferas potencialmente perceptibles por los enemigos naturales, proporcionando información sobre su posición, así como eventualmente su identidad y estado/condición (De Moraes et al., 1998; Heil, 2008).

A diferencia de otras modalidades sensitivas que pueden ser obstaculizadas por barreras físicas (e.g., la visión es limitada si se trata de detectar hospederos ocultos dentro de frutos), las claves químicas resultan más informativas a larga distancia, particularmente aquellas que derivan de las plantas por una cuestión de biomasa. Sin embargo, la detección de estímulos químicos está sujeta a múltiples factores en la naturaleza; la tasa de emisión de los compuestos, la distancia entre el insecto y la fuente emisora, el área de liberación, así como la velocidad del viento, turbulencias, el contraste con olores de fondo, entre otros que pueden interferir en su percepción.

Además, el uso de la información química supone la dificultad adicional de la fidelidad de la señal y cuán asequible sea su detección. En general, las claves derivadas directamente del hospedero son fidedignas, pero difíciles de detectar y de alcance limitado, mientras que aquellas provenientes del primer nivel trófico son fácilmente detectables a pesar de ser menos informativas en términos de fiabilidad de la señal (Dicke et al., 1990; Turlings et al., 1991). Ante este inconveniente, los parasitoides pueden utilizar claves derivadas de los estadios más conspicuos de los hospederos,

aprender claves asociadas al herbívoro detectables con mayor facilidad, o utilizar claves procedentes de las plantas atacadas por su hospedero (Vet & Dicke, 1992; Turlings et al., 1993).

Los insectos liberan sustancias odoríferas en baja cuantía procedentes de las heces, su cutícula y exuvios, secreciones de glándulas, feromonas, hemolinfa, entre otras (Vet & Dicke, 1992). La discreción en cuanto a la emisión de información que pueda revelar su presencia posiblemente sea el resultado evolutivo que ha favorecido la inadvertencia ante los enemigos naturales (Vet & Dicke, 1992). Sin embargo, de la herbivoría resultan inevitablemente emisiones de volátiles que informan indirectamente su presencia. La emisión bajo condiciones de estrés biótico tiende a estar relacionado con el grado de herbivoría (Niinemets et al., 2013). En este sentido, los hospederos quiescentes (huevos y pupas) no proporcionarían información para sus enemigos naturales, los cuales deberían recurrir a la información proporcionada por estadios precedentes (estadio adulto y larval, respectivamente), mientras que la co-ocurrencia de estadios permitiría potencialmente explotar la información derivada de ambos (Vet & Dicke, 1992). De este modo, las plantas adquieren más relevancia al proporcionar información química adicional, de mayor alcance e inclusive con cierta especificidad en función de la identidad del herbívoro (Vet & Dicke, 1992; De Moraes et al., 1998). El daño por herbivoría y/u oviposición puede alterar el perfil de volátiles emitido por la planta, proporcionando claves para la orientación y atracción de enemigos naturales hacia la fuente de emisión (Dicke et al., 1990; Turlings et al., 1990; Mumm & Dicke, 2010).

3.6 Arándanos; *Vaccinium* spp. (Ericales: Ericaceae)

El término *blueberries* refiere a los frutos producidos por cualquier especie perteneciente al género *Vaccinium* (de la sección taxonómica *Cyanococcus*) y de la familia Ericaceae. Son plantas leñosas, perennes y de porte arbustivo. Las especies más conocidas comercialmente son *Vaccinium corymbosum* L. (*highbush blueberry*), *Vaccinium angustifolium* Ait. (*lowbush blueberry*) y *Vaccinium ashei* Reade (*V. virgatum* Ait.) (*rabbiteye blueberry*), comúnmente reconocidas como arándanos. Los arándanos son bayas esféricas de colores mayormente azulados, de 6.2 a 20.8 mm de diámetro y una masa de 0.14 a 3.4 g (Soots et al., 2017). Son frutos climatéricos que requieren manejos apropiados y delicados post-cosecha para preservar su calidad y propiedades organolépticas. Entre las características que contribuyen a la calidad del fruto se incluye su color, firmeza, sabor, aroma, tamaño, así como que se encuentre libre de contusiones. Su contenido de antocianinas se asocia a sus cualidades benéficas sobre la salud humana (Kalt et al., 2020). Tales cualidades popularizaron el fruto, incrementaron su demanda y promovieron la expansión de las áreas cultivadas a nivel global. El mercado de arándanos es uno de los que mayor crecimiento ha experimentado a nivel mundial (Moore, 1993; Strik, 2006), y las proyecciones indican que la tendencia a incrementarse será sostenida (IBO, 2018).

Las variedades de arándanos mencionadas inicialmente son nativas de Norteamérica (Vander Kloet, 1988). Su propagación fuera del rango de distribución de origen fue impulsada por intereses comerciales. América del Sur es una de las principales regiones que acaparó su expansión en la década del '80 y su producción abastece mayormente el mercado europeo. Chile es el principal país productor y exportador de Latinoamérica. El cultivo en el hemisferio sur cubre la producción en contra-estación y ofrece una ampliación del período de abastecimiento de fruta fresca, limitando los cuidados post-cosecha que demanda el producto con sus costos asociados, y posiciona a la región austral como un punto comercialmente estratégico.

La primera plantación en Uruguay se realizó en 1988. En los inicios del 2000 se produce una rápida expansión del área cultivada a nivel nacional y en 2003 se realiza la primera exportación a Estados Unidos. Sin embargo, desde sus inicios a la actualidad, el sector ha experimentado importantes transformaciones en cuanto a la extensión y las variedades cultivadas. En 2009 se superaron las 800 ha. cultivadas, pero esta cifra se redujo a la mitad en los años siguientes. La adversidad climática y una reconversión varietal provocaron una disminución del área cultivada hacia 2015, en 2012 habían 492 ha. y en 2015 346 ha. Las principales zonas cultivadas en el país se encuentran en el litoral norte (Salto y Paysandú), donde se cosecha tempranamente (octubre-noviembre) y en el centro-sur con cosechas más tardías (noviembre-diciembre) (Vilaró & Soria, 2006).

El arándano es uno de los tantos cultivos susceptibles a *D. suzukii*. No obstante, la preocupación que suscita la especie en el sector productivo a nivel global, en términos de impacto no tiene un correlato con la situación a nivel nacional, a pesar de que lleva establecida más de media década (González et al., 2015).

La maduración de los frutos, entendida como la secuencia de cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, puede diferir sustancialmente bajo el ataque de insectos. En nuestro sistema de estudio, el proceso de maduración natural del arándano es notoriamente alterado y acelerado consecuencia del desarrollo de los estadios inmaduros de *D. suzukii*. Los cambios en la fruta son evidentes desde el momento de la oviposición, dado que los espiráculos de los huevos quedan expuestos hacia el exterior a través del orificio generado por el ovipositor (Fig. 3b). La perforación de la piel del fruto ocasiona la pérdida de tensión de la misma. Además, la actividad de la larva y su desarrollo en el interior de la fruta aceleran su colapso durante el progreso de la maduración, provocando la pérdida de consistencia y la reducción de tamaño. La figura 10 muestra la diferencia de los arándanos madurados naturalmente y el efecto del ataque de *D. suzukii* sobre los mismos.

3.7 Métodos de control de *Drosophila suzukii*

Actualmente, el principal método de control de la especie es mediante la aplicación de insecticidas de amplio espectro (Bruck et al., 2011; Burrack et al., 2015; Shawer et al., 2018). Las aplicaciones se realizan periódicamente desde el inicio de la maduración del fruto hasta su cosecha (Haviland & Beers, 2012; Van Timmeren & Isaacs, 2013). El limitado control residual de los insecticidas y los acotados tiempos entre generaciones de *D. suzukii*, requiere recurrir frecuentemente a productos químicos para mantener las densidades poblacionales bajas (Renkema et al., 2016; Van Timmeren & Isaacs, 2013). El hábito polífago de *D. suzukii* no está limitado a variedades cultivables, de forma alternativa se puede desarrollar en diversas especies silvestres que se encuentran fuera del área protegida por interés productivo y le permiten eludir las prácticas dirigidas para su mitigación (Cini et al., 2012; Lee et al., 2015; Poyet et al., 2015; Kenis et al., 2016). A pesar de su efectividad, el uso continuado de insecticidas redundaría en contaminación ambiental, riesgo toxicológico y presiones selectivas de poblaciones resistentes a estos productos. Su baja selectividad produce efectos adversos sobre la fauna benéfica, incluidos los enemigos naturales de la plaga (Roubos et al., 2014; Fontes et al., 2018). Insecticidas comerciales comúnmente utilizados para controlar a *D. suzukii* fueron testados sobre *T. anastrephae* y *Pachycrepoideus vindemmiae* (ambos parasitoides de pupa de *Drosophila*) por Schlesener y colaboradores (2019), resultando tener una susceptibilidad variable según la clase de compuestos y la especie. En términos generales, *T. anastrephae* mostró ser menos susceptible a muchos de los productos probados (Schlesener et al., 2019). Este resultado favorecería a *T. anastrephae* como candidato a ser utilizado como agente controlador en esquemas de manejo que involucre aplicaciones de insecticidas. No obstante, el arándano es un producto de consumo mayoritariamente fresco cuyo principal destino es su comercialización al mercado exterior. El límite máximo permitido de pesticidas permitido en productos de consumo humano impuestos por los países importadores es variable y supone una restricción para el control químico de plagas de incidencia tardía como lo es *D. suzukii*. Asimismo, la utilización de la mayoría de los productos de síntesis es incompatible con prácticas de cultivo orgánicas, las cuales tienen más acotadas las opciones para controlar a *D. suzukii* y donde el desarrollo de resistencia resulta más desafiante. Recientemente, se reportaron los primeros casos de resistencia de *D. suzukii* a uno de los principales bio-insecticidas utilizados para el control de la especie en Estados Unidos (*spinosad*) (Iglesias & Liburd, 2017; Gress & Zalom, 2018).

Dado el impacto de *D. suzukii* en el sector frutícola a nivel global y la preocupación que suscitan las prácticas dirigidas para su mitigación, más la tendencia global hacia prácticas agrícolas que buscan prescindir del uso indiscriminado de productos químicos, resulta indispensable la búsqueda de estrategias alternativas de control de la especie.

3.8 Manejo Integrado de Plagas

El control de plagas incluye toda acción dirigida a evitar, atenuar o retrasar el impacto de las especies en cuestión. A mediados del siglo pasado, el control a través de productos químicos acaparó la atención y el uso excesivo de dichas sustancias alcanzó un punto álgido en la historia. En consideración de los efectos secundarios asociados a tales prácticas; aparición de insectos resistentes, resurgimiento de plagas secundarias y contaminación ambiental, en las décadas siguientes se produce un cambio de paradigma hacia un enfoque más integral del problema en detrimento de la dependencia del control químico (Kogan, 1998). Las distintas técnicas surgidas y la integración de métodos para abordar el tema fueron consolidando el concepto de un Manejo Integrado de Plagas (MIP). El MIP es una estrategia de manejo de especies plaga que, considerando el ambiente y la dinámica poblacional de la plaga, compatibiliza todas las acciones adecuadas para mantener los niveles poblacionales por debajo de los que causan daño económico (Smith & Reynolds, 1966). Uno de los objetivos centrales es compatibilizar el control químico con los agentes de control biológico y la biota restante a través de la incorporación de insecticidas más selectivos (Cloyd, 2012). Un enfoque integral de prácticas requiere un conocimiento profundo de la biología de las especies involucradas y qué factores afectan su desarrollo. Esto permite desfavorecer las condiciones adecuadas para la proliferación de la especie a través de la adopción de prácticas culturales de manejo de los sistemas agrícolas.

Las técnicas que incluyen aleloquímicos representan un nuevo enfoque dentro del MIP. En particular, los volátiles producidos por las plantas en respuesta al ataque por herbívoros han recibido gran atención (Wajnberg & Colazza, 2013), así como las interacciones tri-tróficas que interrelacionan plantas, herbívoros y predadores (parasitoides o depredadores de herbívoros). Este nuevo enfoque consiste en manipular mediante claves y/o señales químicas al tercer nivel trófico para atraerlos y conservarlos en el área a proteger (Khan et al., 2008; Wajnberg & Colazza, 2013). Las estrategias de control que utilizan semioquímicos presentan ventajas en cuanto a que no dejan residuos en el ambiente, actúan a bajas concentraciones y con una elevada especificidad (Thacker & Train, 2010; Witzgall et al., 2010; Ioriatti et al., 2011).

En la región de origen de *D. suzukii* utilizan métodos alternativos y/o complementarios para el control de la especie. En Japón, su control en cultivos de cerezas (*Prunus avium*) y arándanos (*Vaccinium* spp.) incorpora el uso de redes de exclusión (Yamakawa & Watanabe, 1991; Kawase et al., 2008). El control mediante redes resulta extremadamente efectivo en los cultivos de arándanos (Cormier et al., 2015). Sin embargo, es una opción aplicable a escalas reducidas de producción orgánica.

3.8.1 Control biológico

El control biológico puede considerarse parte de un servicio ecosistémico basado en las interacciones ecológicas preexistentes en la naturaleza. Resulta de la acción de los enemigos naturales (predadores, parasitoides, patógenos) en el descenso de la densidad poblacional de otro organismo en relación a los niveles poblacionales que ocurrirían en su ausencia (DeBach, 1964). Esta estrategia de control es un componente fundamental dentro del Manejo Integrado de Plagas (Ehler, 2006). Una de las estrategias de control biológico se basa en la liberación masiva de enemigos naturales criados en laboratorio, los cuales se encuentran presentes a bajos niveles poblacionales en el campo, en búsqueda de una rápida mortalidad en las poblaciones del hospedero (Parra et al., 2002).

En este sentido, *D. suzukii* ha puesto a prueba a los enemigos naturales de distintas regiones del mundo. Numerosas especies de parasitoides se han asociado con *D. suzukii*, cada una presenta un grado de especificidad y eficacia particular. A pesar de que las especies que tienen la capacidad de regular las densidades poblacionales eficientemente son limitadas (Chabert et al., 2012; Rossi Stacconi et al., 2013; Gabarra et al., 2015; Rossi-Stacconi et al., 2015), la introducción de agentes de control biológico eficientes en nuevos ambientes requiere estudios de impacto (Louda et al., 2003; Pearson & Callaway, 2005). Los géneros *Asobara*, *Ganaspis*, *Leptopilina*, *Trichopria* y *Pachycrepoideus* incluyen especies de enemigos naturales presentes en la región de origen de *D. suzukii* con mayor posibilidad de controlar eficientemente la especie dado su historia de co-evolución (Daane et al., 2016). Sin embargo, el uso de poblaciones locales de *Trichopria drosophilae* como en México e Italia resultó más efectivo y dio inicio al desarrollo de técnicas para su producción masiva (Rossi Stacconi et al., 2018).

Drosophila suzukii posee un complejo sistema de defensa inmune caracterizado por una elevada carga de hemocitos en la hemolinfa (Lavine & Strand, 2002; Poyet et al., 2013). La encapsulación es el principal mecanismo fisiológico de defensa descrito contra endoparasitoides, activado cuando son superadas las dimensiones para ser fagocitados e involucra distintos tipos de hemocitos del estadio larval (Carton & Nappi, 1997). En este aspecto, *D. suzukii* y *D. melanogaster*, comparten similitudes morfológicas y funcionales en cuanto a las clases de hemocitos. Sin embargo, en términos cuantitativos, algunos estudios señalan que las larvas de *D. suzukii* presentan cantidades considerablemente superiores a las de *D. melanogaster* y ha sido asociado con una mayor habilidad de *D. suzukii* para sortear parasitoides (Poyet et al., 2013).

Dada la eficaz respuesta del sistema inmune por parte del estadio larval de *D. suzukii* y la ausencia de encapsulamiento de los huevos depositados en pupas, los parasitoides de pupa como

P. vindemmiae (Rondani) (Hymenoptera: Pteromalidae) y *Trichopria drosophilae* (Perkins) (Hymenoptera: Diapriidae) podrían ser más exitosos ante *D. suzukii* que los parasitoides de larva (Kacsoh & Schlenke, 2012). Una especie del género *Trichopria*, *Trichopria anastrephae* (Lima) (Hymenoptera: Diapriidae), es un endoparásitoide de pupa nativo de Sudamérica (Corseuil & Garcia, 2004; Cruz et al., 2011) capaz de utilizar a *D. suzukii* como hospedero (Wollmann et al., 2016; Andreazza et al., 2017). Esta cualidad captó la atención de la especie como un potencial agente de control de *D. suzukii* en la región neotropical. Si bien es limitada la información de *T. anastrephae* en la literatura científica, en los últimos años se ha señalado esta especie por su capacidad de parasitar a *D. suzukii* (Wollmann et al., 2016; Andreazza et al., 2017; Bernardi et al., 2017; Schlesener et al., 2019).

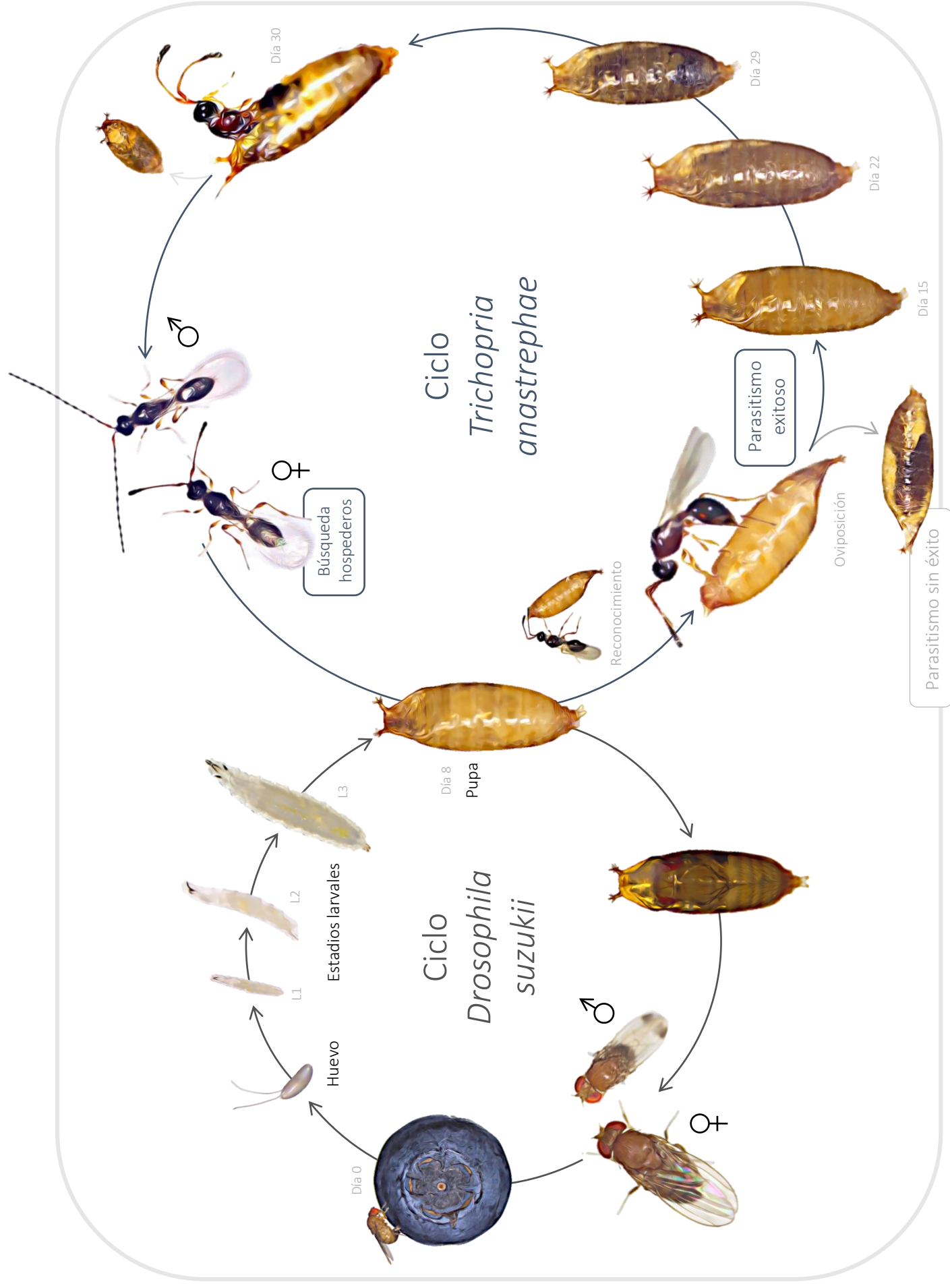


Figura 8. Ciclos de vida de *Drosophila suzukii* (izquierda) y *Trichopria anastrephae* (derecha).

3.9 Ritmo biológico del comportamiento

La diversificación de los seres vivos tuvo lugar en un contexto marcado por regímenes periódicos de fases alternantes de luz y oscuridad dictadas a nivel planetario por la rotación de la Tierra. En consecuencia, la gran mayoría de los organismos presentan mecanismos moleculares endógenos sensibles a dicha fluctuación ambiental que subyacen a aspectos fisiológicos y comportamentales, permitiendo su anticipación y optimización de sus respuestas al ambiente (Panda et al., 2002; Bell-Pedersen et al., 2005).

Los ritmos circadianos poseen una periodicidad entre 20 y 28 horas en ausencia de clave ambiental sincronizadora. Básicamente, la referencia del sistema se suele explicar por la oscilación de relojes internos que se anclan a claves externas y típicamente la periodicidad luz-oscuridad es el factor exógeno que establece el ritmo (Pittendrigh, 1960; Bell-Pedersen et al., 2005).

Comprender la ecología del comportamiento de los parasitoides, como ser los patrones de actividad circadiana, puede contribuir a desarrollar programas efectivos de manipulación de laboratorio y liberación en el campo para el control biológico de plagas. En algunos sistemas, el conocimiento de los patrones horarios de eclosión y búsqueda de pareja permite restringir temporalmente las liberaciones y generar controles más eficaces (Chen et al., 2020). Otro caso puede suceder con la superposición de picos de actividad entre especies de parasitoides con lo que la liberación simultánea de ambas puede resultar en una competencia sustancial, reduciendo la eficacia del control (Miranda et al., 2015). Además, la estrategia podría ser optimizada teniendo en consideración otros métodos de control como ser la aplicación de insecticidas, dado que la crono-toxicidad de los insectos puede estar en función de los picos de actividad (Pszczolkowski et al., 2004; Hamby et al., 2013).

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

El comportamiento de búsqueda de hospederos por parte de parasitoides es fuertemente influenciado por claves químicas. Ante el arribo de una especie invasora, el parasitoide residente debería discernir mediante claves químicas volátiles resultantes de una interacción novedosa, la posición precisa de un potencial hospedero, imprescindible para completar su desarrollo y consecuentemente en su consideración como agente de control biológico. En algunos sistemas biológicos bajo condiciones no naturales está documentada la capacidad de asociar nuevos estímulos relacionados al hospedero, así como la habilidad de parasitar un hospedero exótico relacionado filogenéticamente a su habitual hospedero.

El presente trabajo estudia la atracción de un parasitoide residente de la región, *T. anastrephae* (Hymenoptera: Diapriidae), hacia un hospedero exótico, *D. suzukii* (Diptera: Drosophilidae), mediada por semioquímicos a través de ensayos de olfatometría en condiciones de laboratorio. El sistema tri-trófico de estudio fue evaluado en base a la respuesta comportamental de preferencia hacia compuestos volátiles resultantes de la interacción entre los niveles tróficos inferiores, específicamente de *D. suzukii* desarrollándose en arándanos (*Vaccinium* spp.; Ericales: Ericaceae), para evaluar la capacidad de detección y atracción a distancia hacia un potencial hospedero por parte de *T. anastrephae*.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1. Evaluar la atracción de *T. anastrephae* hacia arándanos atacados por *D. suzukii*.

4.2.2. Analizar la respuesta comportamental de *T. anastrephae* en función del horario del día.

5 Materiales y Métodos

5.1 Insectos

El trabajo experimental fue realizado en el Laboratorio de Ecología Química en Facultad de Química (UdelaR). Los insectos empleados se obtuvieron de la cría artificial realizada en el Laboratorio de Ecología Química, la cual está basada en dos especies de moscas *Drosophila*, *D. suzukii* y *D. melanogaster*, y parasitoides microhimenópteros de larva (*Leptopilina* sp.) y pupa (*P. vindemmiae* y *T. anastrephae*) de *Drosophila* (ver Anexo 9.3). Las colonias de *D. suzukii* y *T. anastrephae* fueron establecidas en abril de 2019 (más de 35 y 25 generaciones a la fecha, respectivamente) a partir de ejemplares capturados en el predio de Facultad de Agronomía (UdelaR), Montevideo. El sexado de los parasitoides se realiza por las dimensiones y tipo de antena que es un carácter sexual dimórfico fácilmente identificable (Fig. 5a y b).

5.2 Dispositivo experimental

Para evaluar si las hembras de *T. anastrephae* responden a arándanos atacados por *D. suzukii*, se realizaron ensayos comportamentales en olfatómetros de doble opción. En los dispositivos de olfatometría se evalúa la respuesta comportamental de un artrópodo en base a las preferencias a dos o más olores que recrean un contexto ecológicamente relevante. Son ampliamente utilizados en investigación en el área de la Ecología Química para evaluar la localización de hospederos, particularmente el comportamiento de búsqueda y atracción a hospederos por parte de parasitoides. En este caso, la estimulación se restringió exclusivamente a la percepción a distancia de volátiles emitidos de una fuente no visible para el insecto.

Se realizaron ensayos preliminares durante la configuración del sistema de estudio y la puesta a punto del mismo. Fueron testados distintas dimensiones de olfatómetros, tipo de iluminación, métodos de grabación y trackeo del comportamiento a partir del material de grabación, así como fueron ajustados y optimizados los tiempos de cría de los insectos y la estimulación utilizada.

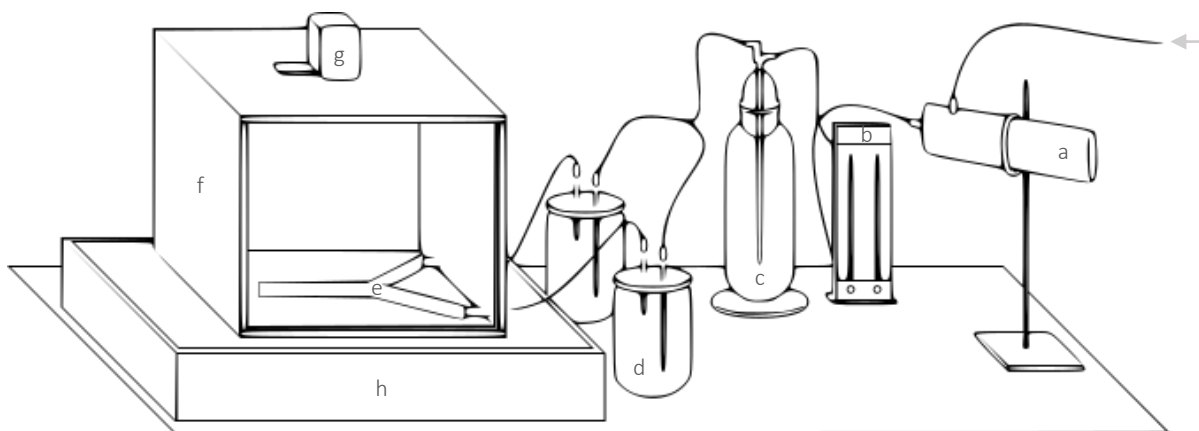


Figura 9. Esquema del dispositivo de olfatometría utilizado. El aire procedente del exterior es impulsado por una bomba (no representada) en el sentido indicado por la flecha, el cual previamente a ingresar al sistema, es filtrado con carbón activado (a) y humidificado (c). El caudal de aire circulante es controlado por el regulador de flujo (b). Los recipientes (d) contienen los estímulos y la corriente de aire arrastra los compuestos volátiles que ingresan por los brazos del olfatómetro (e). El tubo en Y se dispone sobre un iluminador de luz fría (h) y dentro de una caja de paredes blancas (f). En la parte superior de la caja se encuentra la cámara de video que registra la actividad del parasitoide (g).

5.3 Estímulos

Se evaluaron dos estímulos; frutos atacados por *D. suzukii* y frutos sin atacar. Cada estímulo consistió de 25 g de arándanos comerciales (Frusan, Frutera San Fernando, Chile) cuidadosamente seleccionados procurando la integridad de los mismos, previamente lavados con abundante agua destilada y secados. Para el estímulo atacado con *D. suzukii*, los 25 g de arándanos dispuestos en recipientes de vidrio fueron incubados por 24 horas con 10 hembras adultas de *D. suzukii* apareadas bajo las mismas condiciones en que se mantiene la cría de insectos para que ovipongan. El control del ataque (misma cantidad de arándanos sin atacar) fue acondicionado en igualdad de condiciones y por el mismo lapso temporal. Los recipientes fueron cubiertos con un tul en la parte superior sujetos con una banda elástica. Al término de las 24 horas fueron retiradas las moscas y se corroboró el grado de ataque bajo lupa por la presencia de perforaciones en la piel de la fruta por las que quedan expuestos el par de espiráculos de color blanco de los huevos. El recipiente con el estímulo se dispuso en la incubadora por 10 días para que avanzara el desarrollo de los estadios inmaduros de la mosca sobre la fruta y asegurar que se alcance el estadio de pupa hospedero del parasitoide. Transcurridos los 10 días, y como consecuencia del desarrollo larval en su interior (Fig. 10), la fruta posee un perfil de volátiles diferente al de los arándanos madurados naturalmente (de la Vega et al., 2020, en revisión). Dicho grado de maduración es representativo de la estimulación ofrecida en los ensayos de olfatometría.

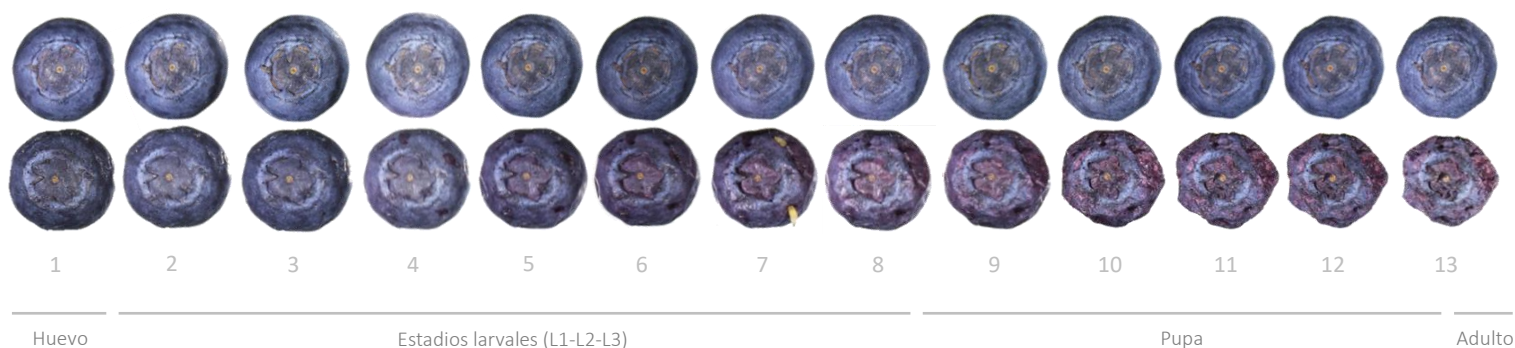


Figura 10. Progreso de la maduración durante 13 días de un arándano madurado naturalmente (arriba) y de arándano atacado durante 24 horas por *Drosophila suzukii* (abajo). Los números indican los días correspondientes post-oviposición. En la parte inferior se referencia el estadio de desarrollo de la mosca aproximado bajo las condiciones en que fueron acondicionados.

5.4 Procedimiento experimental

Se evaluaron individualmente por única vez hembras adultas de *T. anastrephae* de entre dos a cinco días de edad, obtenidas de tubos con pupas de *D. melanogaster*, previamente alimentadas (50:50 agua:miel) y apareadas. En total se evaluaron tres tratamientos; dos de los cuales contenían arándanos atacados con *D. suzukii* como estímulo, uno con arándanos libres de ataque (*Atacados vs Sin daño*) y otro con aire limpio (*Atacados vs Aire limpio*) a modo de control. El restante tratamiento ofrecía arándanos libres de ataque contra aire limpio (*Sin daño vs Aire limpio*). Los ensayos fueron realizados en distintos días dentro del rango horario de 09:00 a 18:00 horas, comprendido en la fase lumínica de la incubadora de cría (el fotoperíodo (12:12) donde se mantienen los insectos es de 09:00 a 21:00 horas). Las avispas eran depositadas en una precámara en la base de la sección común del tubo en Y e ingresaban al dispositivo por sus propios medios. Una vez dentro del olfatómetro, se iniciaba la grabación y se registraba la actividad del parasitoide durante 300 segundos. Transcurridos los 300 segundos, el individuo era retirado utilizando un aspirador de insectos en caso de ser necesario.

En cada repetición se alternó el brazo por el que procedía el estímulo para evitar cualquier asimetría en el dispositivo experimental. Previo a cada repetición, se hacía circular aire limpio durante 60 segundos por el brazo en que procedía anteriormente el estímulo para eliminar cualquier residuo que pudiera interferir en la siguiente réplica. Cada 30 minutos se registraba simultáneamente la temperatura y humedad en el interior del olfatómetro mediante un sensor de temperatura y humedad (sensor DHT22 conectado a micro-controlador Arduino). Las temperaturas probadas oscilaron entre 21.5 a 24.9°C y la humedad entre 64.5 y 81.9%.

El olfatómetro fue limpiado con agua y jabón, alcohol y acetona previo a ser secado en estufa a 100°C al finalizar cada jornada de registro.

A partir de la grabación se analizó la permanencia temporal en las distintas zonas de interés del dispositivo experimental, la primera elección y la posición final de la avispa. A su vez, dichos parámetros se analizaron en relación a tres rangos horarios: mañana (09:00 a 12:00), mediodía (12:00 a 15:00) y tarde (15:00 a 18:00). Las grabaciones fueron analizadas manualmente a través del reproductor de video *VLC Media Player* desde donde se extrajeron los tiempos de permanencia en cada brazo, la primera opción (registrada una vez que la avispa atravesó una línea definida en cada brazo a 5 mm de la bifurcación del olfatómetro) y la última posición de la avispa a los 300 segundos.

5.5 Análisis estadístico

Las variables a evaluar fueron la primera elección, la posición al finalizar el experimento y el tiempo de permanencia en cada sección del olfatómetro. Tanto la primera elección como la última posición en el tubo en Y son representados en forma porcentual a partir del conteo directo de las veces que optaron por cada brazo. Para su análisis estadístico, se realizó un test binomial exacto con probabilidad 0.5 de éxito para la primera elección (brazo del estímulo o brazo control) y probabilidad de 0.33 para la posición final (brazo del estímulo, control o sección en común). Para los tiempos de permanencia en cada brazo del dispositivo se promediaron los tiempos de las réplicas de cada tratamiento y se representaron porcentualmente en función de brazo estímulo y brazo control con su error estándar correspondiente. Las diferencias entre los promedios se evaluaron mediante un test de Student pareado. Para observar la variación de la preferencia a lo largo del día se realizó un índice de preferencia ($\text{Índice} = (\text{Tiempo estímulo} - \text{Tiempo control}) / \text{Tiempo total}$). La magnitud (0 a 1) es proporcional a la preferencia y el signo indica el brazo optado (Índice > 0: Estímulo; Índice < 0: Control). Todos los análisis de datos, estadísticos y gráficos fueron realizados en R (R Core Team, 2019).

6 Resultados

Los ensayos de olfatometría totalizaron 304 réplicas entre los tres tratamientos (103 *Sin daño vs Aire limpio*, 92 *Atacados vs Aire limpio*, 109 *Atacados vs Sin daño*). Del número total de réplicas, fueron excluidas del análisis de datos aquellas réplicas en las que el insecto permaneció inmóvil durante la totalidad del tiempo del ensayo (75 *Sin daño vs Aire limpio*, 39 *Atacados vs Aire limpio*, 37 *Atacados vs Sin daño*). Las réplicas analizadas representan un 27% de *Sin daño vs Aire limpio* (28 réplicas), 58% de *Atacados vs Aire limpio* (53 réplicas) y 66% de *Atacados vs Sin daño* (72 réplicas) en relación al total de los respectivos tratamientos. Como una forma de evaluación de la metodología utilizada, en la figura 11 se muestra la cantidad de muestras totales realizadas y el número de insectos que mostraron movilidad en función de los rangos horarios establecidos.

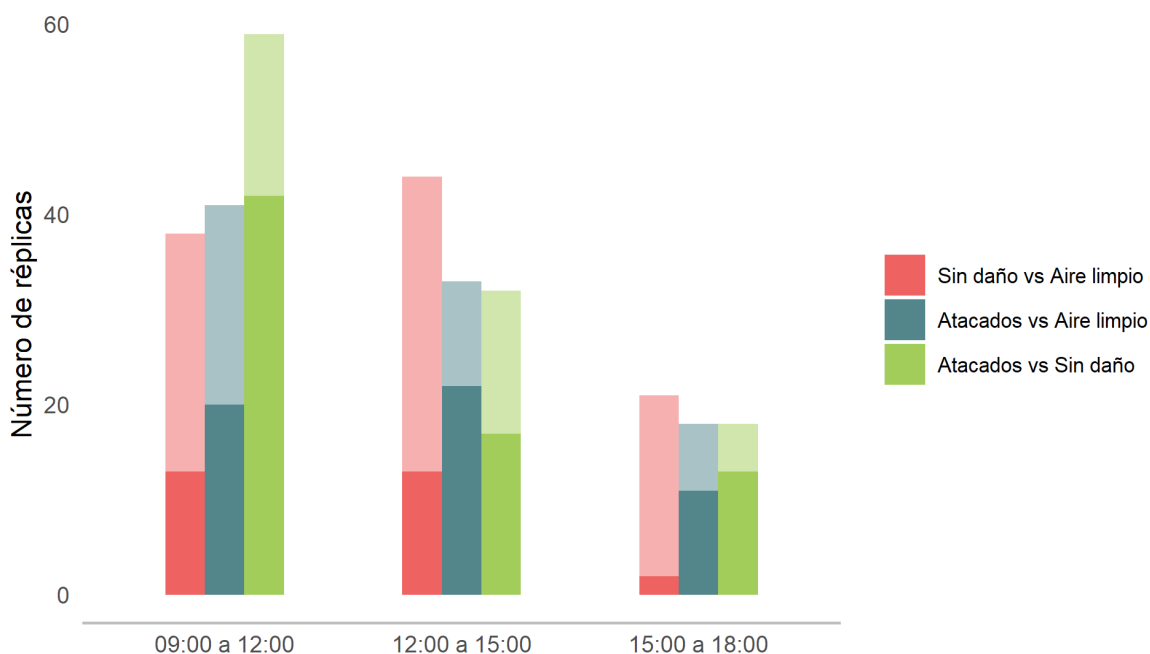


Figura 11. Número total de réplicas de cada tratamiento por rangos horarios; mañana (09:00 a 12:00), mediodía (12:00 a 15:00) y tarde (15:00 a 18:00). Las barras en color más intenso representan el número de réplicas donde se registró movilidad de la avispa (153 réplicas en total) y se superponen al total de réplicas realizadas (color más tenue).

Como se observa en la figura 11, la mayor cantidad de réplicas descartadas por inmovilidad en los tres rangos horarios corresponden al tratamiento que no involucra arándanos atacados por *D. suzukii* (*Sin daño vs Aire limpio*). En tanto que la presencia del ataque de *D. suzukii* en los demás tratamientos genera aproximadamente un 60% de movilidad en las hembras de *T. anastrephae*.

6.1 Detección y atracción a los estímulos

Los resultados del análisis de la primera elección tomada por la avispa sin considerar el horario (Fig. 12), muestran que existe una preferencia hacia el brazo del estímulo para los tres tratamientos por sobre el brazo control. Estas diferencias fueron comprobadas estadísticamente solo para el tratamiento *Atacados vs Aire limpio* donde la diferencia a favor del estímulo (arándanos atacados por *D. sukuii*) resultó ser significativa (p-valor = 0.027). Sin embargo, para los tratamientos *Atacados vs Sin daño* y *Sin daño vs Aire limpio*, las diferencias observadas no tienen significancia estadística (p-valor = 0.288 y p-valor = 0.571, respectivamente).

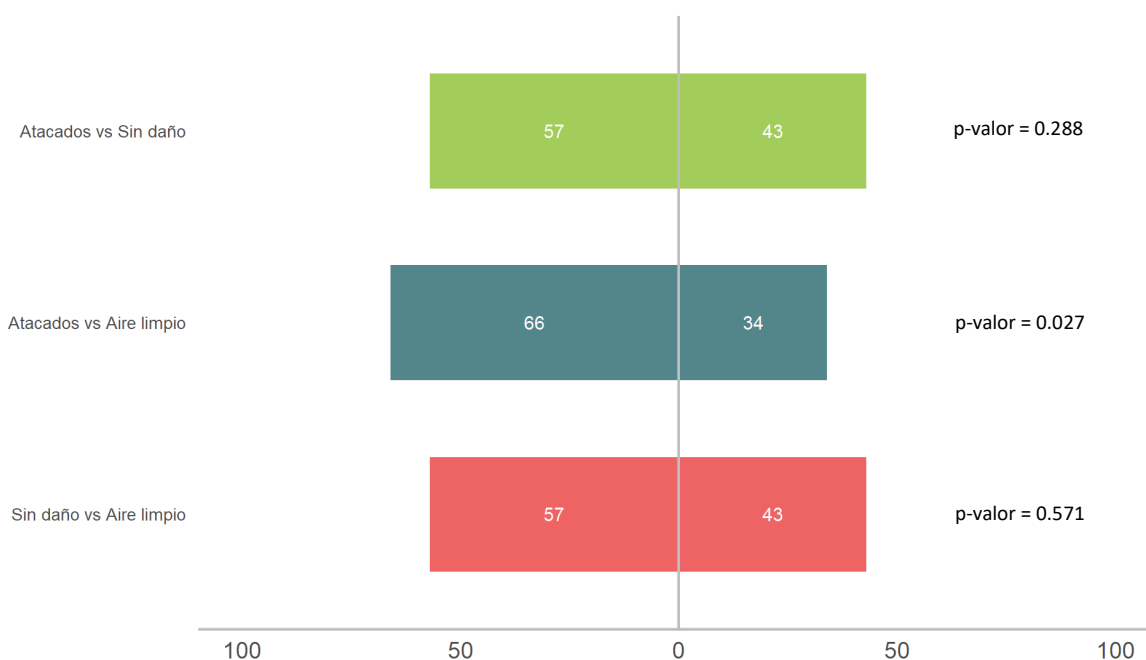


Figura 12. Porcentaje de primeras elecciones de hembras de *Trichopria anastrephae* en olfatómetro de doble opción en respuesta a los volátiles emitidos de arándanos atacados por *Drosophila sukuii* y a arándanos sin atacar. Las barras hacia la izquierda representan el brazo del estímulo y hacia la derecha su respectivo control. En el margen derecho se informa el valor del p-valor del test binomial exacto ($p = \frac{1}{2}$).

El tiempo de permanencia promedio en los brazos del olfatómetro para cada tratamiento (Fig. 13) muestra la misma tendencia, es decir, el brazo por el que procedía el estímulo fue más preferido en términos de tiempos promedios. Los valores promedios en el brazo elegido por las hembras de *T. anastrephae* siempre fueron superiores a 100 segundos, un tercio del total de la grabación en cada bioensayo; *Atacados vs Sin daño* (113 ± 13 segundos), *Atacados vs Aire limpio* (130 ± 16 segundos) y *Sin daño vs Aire limpio* (116 ± 22). Las diferencias estadísticas muestran que sólo la tendencia del tratamiento *Atacados vs Aire limpio* tiene diferencias significativas ($t_{52} = 3.17$, p-valor = 0.0019). En tanto que no existen diferencias significativas para los tratamientos *Atacados vs Sin daño* ($t_{71} = 1.61$, p-valor = 0.1084), ni *Sin daño vs Aire limpio* ($t_{27} = 1.62$, p-valor = 0.1094).

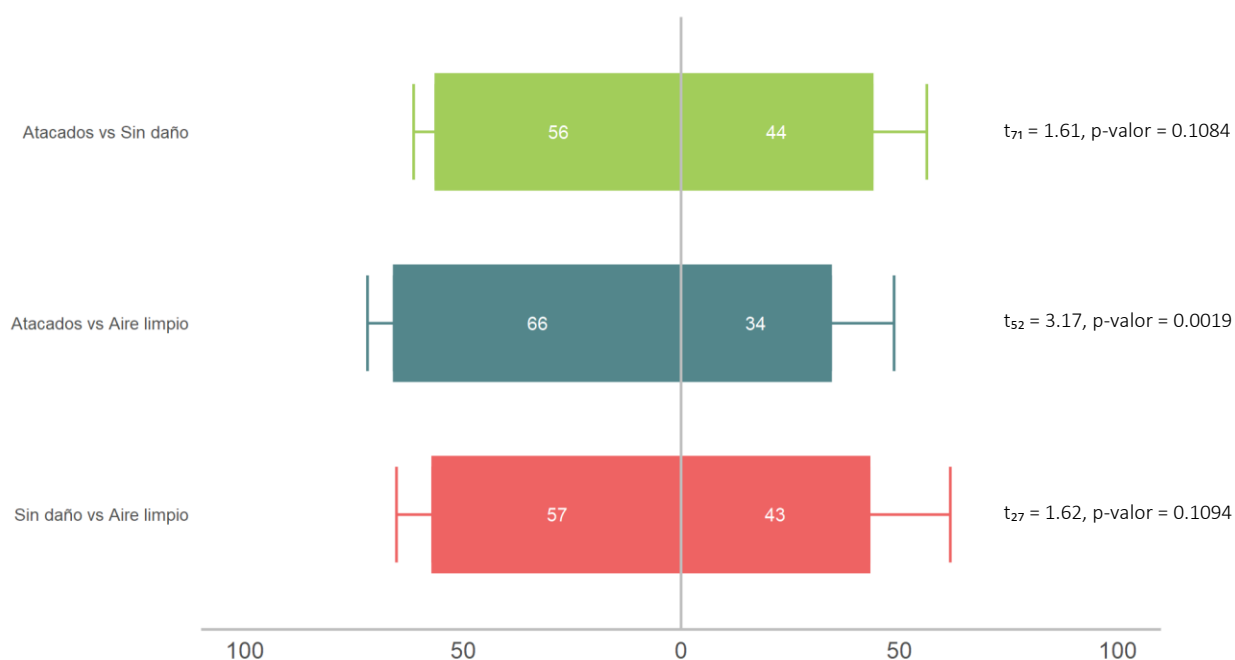


Figura 13. Porcentaje del tiempo de permanencia promedio de hembras de *Trichopria anastrephae* en cada brazo del olfatómetro de doble opción en respuesta a los volátiles emitidos de arándanos atacados por *Drosophila suzukii* y arándanos sin atacar. Las barras hacia la izquierda representan el brazo del estímulo y hacia la derecha su respectivo control. Cada barra posee asociado su correspondiente error estándar. En el margen derecho se informa el valor del estadístico y el p-valor del t-test pareado.

En el caso de la posición de la avispa transcurridos los 300 segundos (posición final) (Fig. 14), la tendencia observada hacia el brazo del que procede el estímulo en la primera elección, así como en el tiempo de permanencia, se acentúa. La preferencia por el brazo del estímulo es significativa para los tratamientos *Atacados vs Aire limpio* y *Atacados vs Sin daño* (p-valor = 0.000638 y p-valor = 0.003, respectivamente). En el tratamiento *Sin daño vs Aire limpio* no se observan diferencias significativas (p-valor = 0.548).

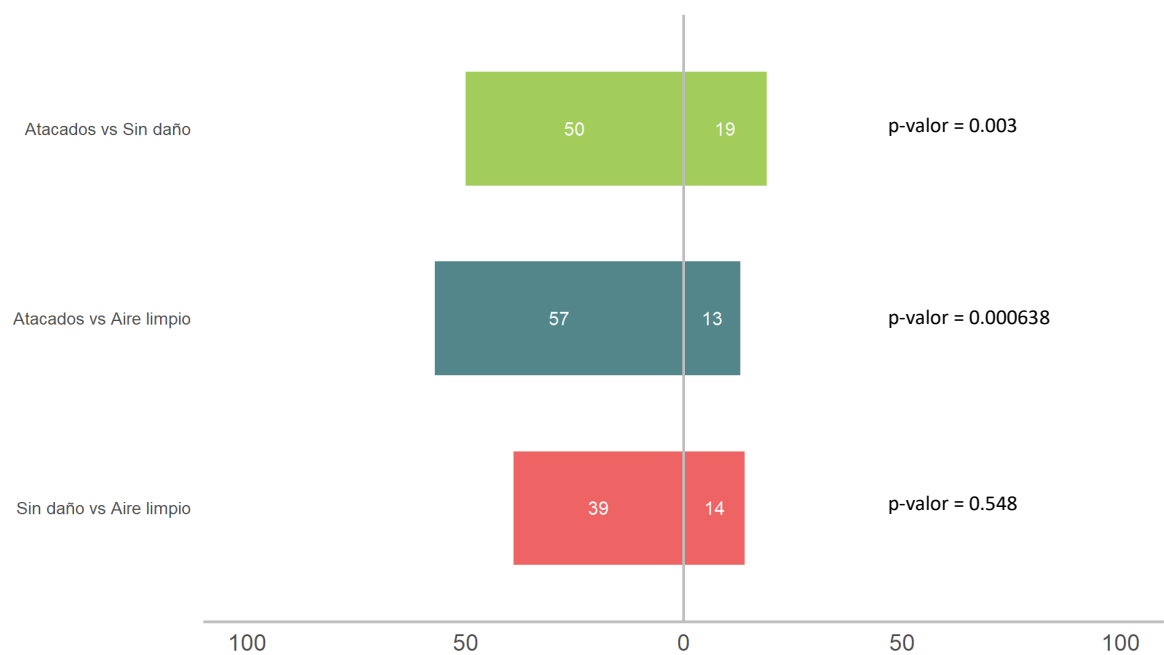


Figura. 14. Porcentaje de últimas elecciones de hembras de *Trichopria anastrephae* en olfactómetro de doble opción en respuesta a los volátiles emitidos de arándanos atacados por *Drosophila suzukii* y a arándanos sin atacar. Las barras hacia la izquierda representan el brazo del estímulo y hacia la derecha su respectivo control. La diferencia porcentual que resta en cada tratamiento se corresponde a la cantidad de réplicas en que el insecto terminó en la zona neutral del dispositivo (31% para el tratamiento *Atacados vs Sin daño*, 30% en *Atacados vs Aire limpio* y 47% en *Sin daño vs Aire limpio*). En el margen derecho se informa el p-valor del test binomial exacto ($p = \frac{1}{3}$).

6.2 Respuestas en función del horario

De acuerdo con el análisis de la primera elección (Fig. 12), el único tratamiento que presentó diferencias significativas a favor del brazo del estímulo fue el que compara arándanos atacados con aire limpio (*Atacados vs Aire limpio*). Sin embargo, al analizar la primera elección considerando el momento del día, no se registra un momento del día donde se observe diferencias significativas. No obstante, la tendencia a ser más preferido el brazo del estímulo se mantiene y es más acentuada en la tarde con diferencias marginalmente significativas (p-valor = 0.065). En los restantes tratamientos (*Atacados vs Sin daño* y *Sin daño vs Aire limpio*) también resulta en una tendencia no significativa a ser más preferido el brazo del estímulo, excepto en el horario de la mañana donde no se observa una preferencia (*Atacados vs Sin daño*) o es ligeramente favorable al brazo control (*Atacados vs Aire limpio*).

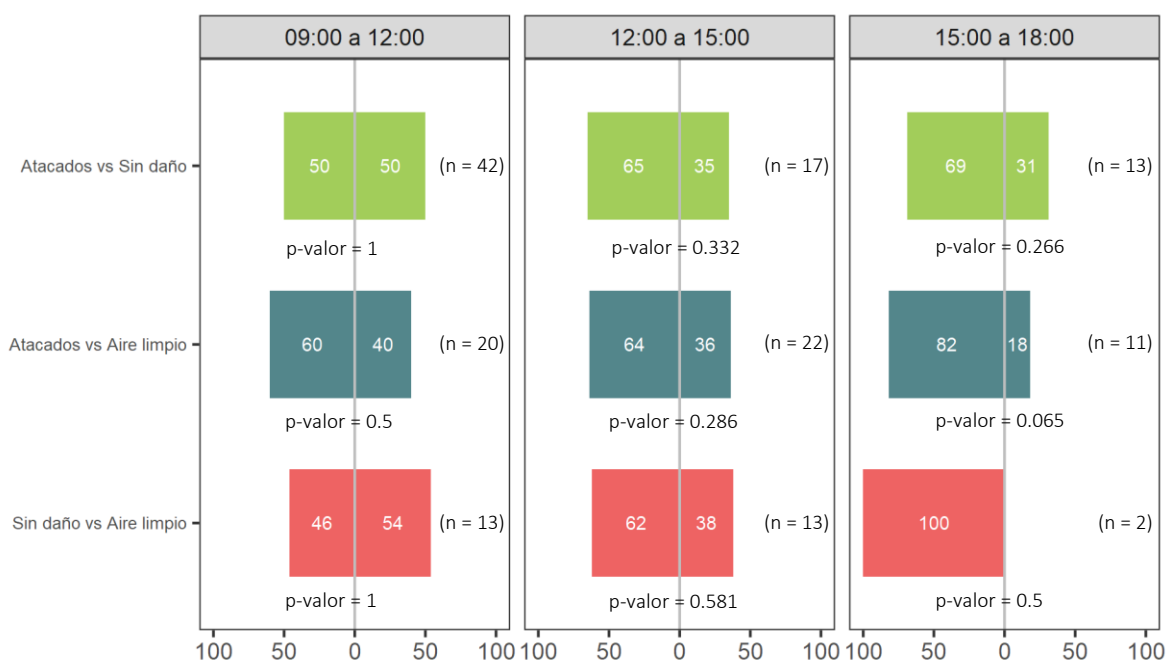


Figura 15. Porcentaje de primeras elecciones en cada tratamiento por rango horario; mañana (09:00 a 12:00), mediodía (12:00 a 15:00) y tarde (15:00 a 18:00). Las barras hacia la izquierda representan el brazo del estímulo y hacia la derecha su respectivo control. Debajo de cada gráfico de barra se indica el p-valor del test binomial exacto ($p = \frac{1}{2}$) y a la derecha el número de réplicas entre paréntesis en cada caso.

Así como se observó una diferencia significativa en el tiempo de permanencia (sin considerar el horario) para el tratamiento *Atacados vs Aire limpio* favorable al estímulo (Fig. 13), también se presenta una preferencia en términos del momento del día. La tendencia hacia el brazo del estímulo observada para los distintos rangos horarios en dicho tratamiento resulta significativa únicamente para el rango de 15:00 a 18:00 (p-valor = 0.0008). A su vez, no se observa una diferencia significativa para el tratamiento con arándanos madurados naturalmente como control del ataque por *D. suzukii* (*Atacados vs Sin daño*) (Fig. 16).

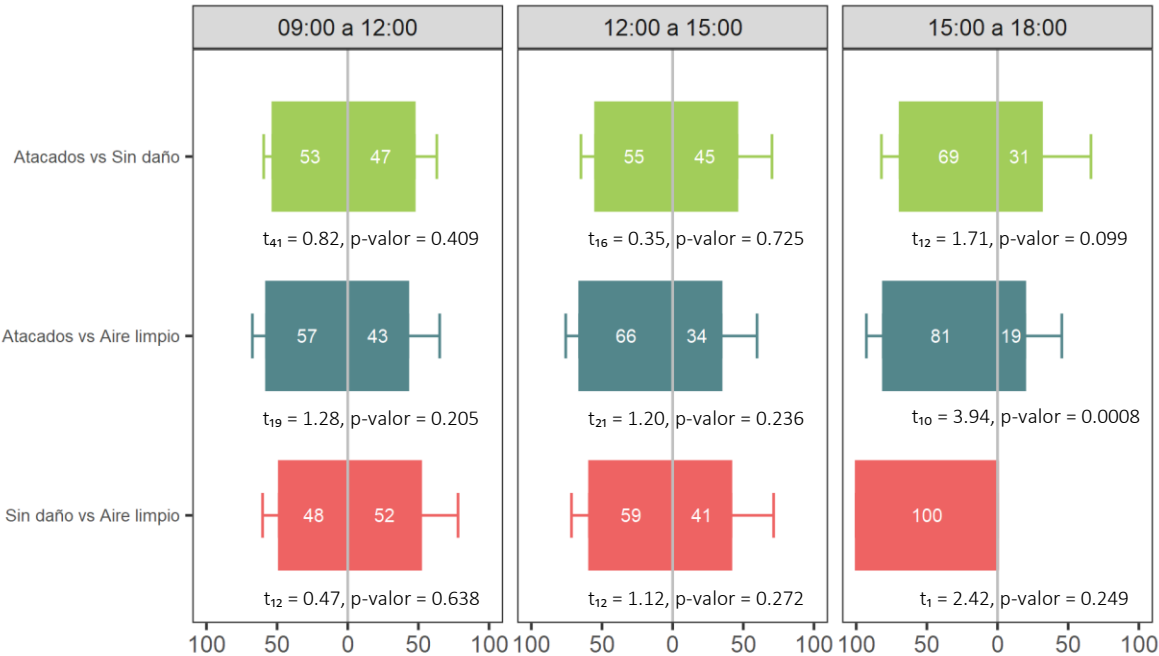


Figura 16. Tiempo promedio porcentual de permanencia en cada brazo por tratamiento y en cada rango horario; mañana (09:00 a 12:00), mediodía (12:00 a 15:00) y tarde (15:00 a 18:00). Las barras hacia la izquierda representan el brazo del estímulo y hacia la derecha su respectivo control, ambos con su error estándar asociado. Debajo de cada gráfico se informa el valor del estadístico y el p-valor del t-test pareado.

Al descomponer las réplicas del análisis de la última elección al finalizar el experimento según su horario de realización (Fig. 17), encontramos que la preferencia varía con la hora y según el tratamiento. Mientras que para el tratamiento cuyo control es aire limpio (*Atacados vs Aire limpio*) las diferencias significativas se registran al mediodía (p-valor = 0.04037) y a la tarde (p-valor = 0.001264), para el tratamiento que contiene arándanos madurados naturalmente como control (*Atacados vs Sin daño*) las diferencias a favor del estímulo con significancia estadística se encuentran en la mañana (p-valor = 0.0493). El tratamiento que no contiene arándanos atacados (*Sin daño vs Aire limpio*) se observa una tendencia no significativa a favor del estímulo.

La diferencia porcentual para completar la totalidad (100%) en cada par de barras representa la cantidad de réplicas en las que la avispa culmina el ensayo en la zona neutra del olfatómetro.

En ambos tratamientos con arándanos atacados (*Atacados vs Aire limpio* y *Atacados vs Sin daño*), el mayor número de posiciones finales en zona neutra se registra a la mañana (50% y 33%, respectivamente) y disminuye en el transcurso del día. La disminución es mayor para el tratamiento *Atacados vs Aire limpio* (22% al mediodía y 9% a la tarde), mientras que en el tratamiento *Atacados vs Sin daño* disminuye a 29% al mediodía y a 23% en la tarde.

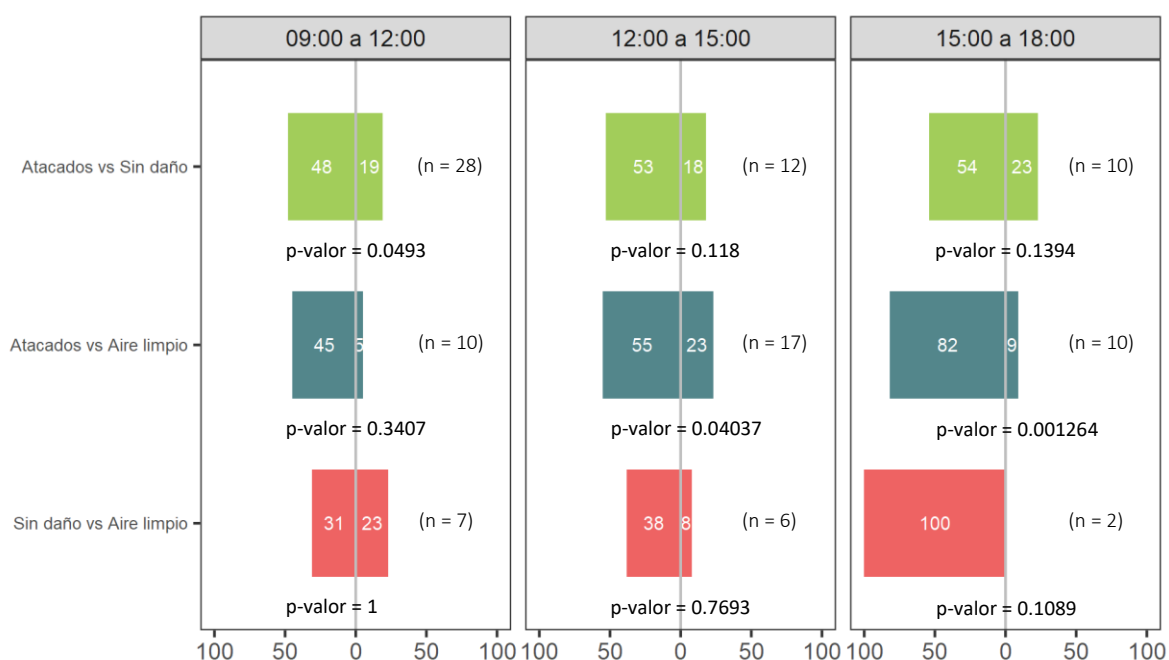


Figura 17. Porcentaje de últimas elecciones en cada tratamiento por rango horario; mañana (09:00 a 12:00), mediodía (12:00 a 15:00) y tarde (15:00 a 18:00). Las barras hacia la izquierda representan el brazo del estímulo y hacia la derecha su respectivo control. Debajo de cada gráfico de barra se indica el p-valor del test binomial exacto ($p = \frac{1}{3}$) y a la derecha el número de réplicas entre paréntesis en cada caso.

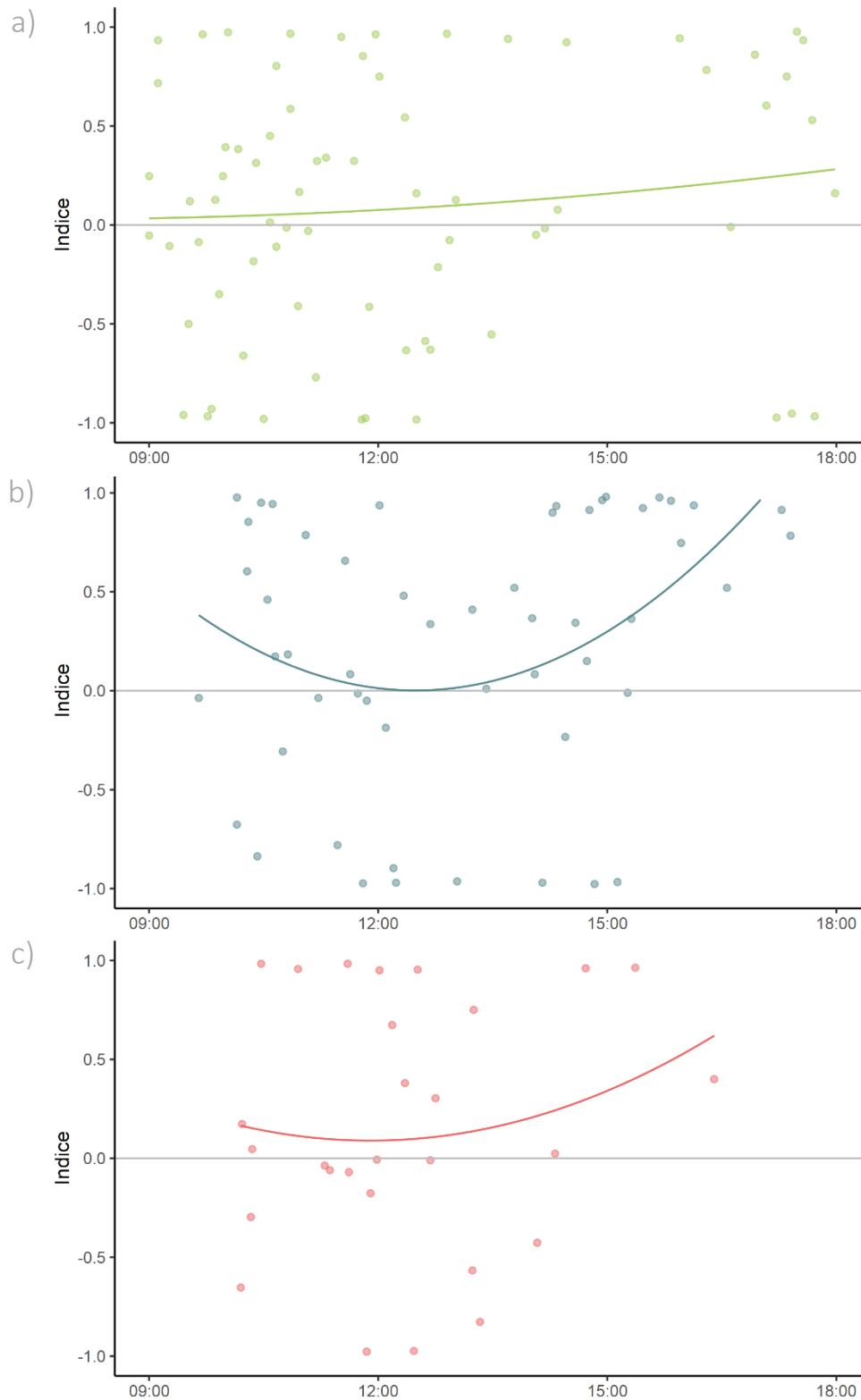


Figura 18. Índice de preferencia en función de la hora del día para cada tratamiento con su correspondiente curva de ajuste; *Atacados vs Sin daño* (p-valor = 0.6292) en verde, *Atacados vs Aire limpio* (p-valor = 0.02357) en azul y *Sin daño vs Aire limpio* (p-valor = 0.6554) en color rojo.

El índice de preferencia presenta una relación con la hora del día para el tratamiento que evalúa arándanos atacados por *D. suzukii* contra aire limpio (*Atacados vs Aire limpio*) (Fig. 18b), mientras que en los restantes tratamientos (*Atacados vs Sin daño* y *Sin daño vs Aire limpio*) (Fig. 18a y 18c, respectivamente) no se observa una preferencia en ningún rango horario. El tratamiento *Atacados vs Aire limpio* muestra un descenso del índice de preferencia hacia las horas centrales del día e incrementos hacia horas iniciales y finales del día (Fig. 18b). La línea de tendencia del índice de preferencia en función de la hora que resulta del tratamiento *Atacados vs Aire limpio* presenta valores positivos en los extremos y nulos en el centro. Comienza con valores próximos a 0.5, desciende a 0 hacia las horas centrales del día y se incrementa con las horas hasta valores próximos a la unidad.

7 Discusión

El presente trabajo evaluó la preferencia de un parasitoide residente, *T. anastrephae*, a claves químicas que resultan de la interacción entre niveles tróficos inferiores de un sistema tri-trófico que involucra una especie invasora de gran relevancia a nivel mundial, *D. suzukii*, presente en Uruguay hace más de media década, y una de las principales frutas de piel fina de exportación del país, el arándano (*Vaccinium* spp.). La tesina desarrolla dos objetivos específicos: en primer lugar, se indagó si existía una preferencia de *T. anastrephae* a los estímulos químicos relacionados con arándanos atacados por *D. suzukii*. En segundo lugar, si existía una variación en la respuesta comportamental del parasitoide en función del horario del día.

Respuesta comportamental y capacidad de detección del hospedero

Nuestros resultados muestran que la presencia de arándanos atacados en la estimulación ofrecida en el olfatómetro provoca una mayor movilidad de las hembras adultas de *T. anastrephae*. Este punto es evidente en el número de réplicas que sí tuvieron una elección, ya sea el brazo del estímulo o el brazo control para cada tratamiento. Del tratamiento que no involucra arándanos atacados (*Sin daño vs Aire limpio*) el 73% de las réplicas fueron descartadas por inmovilidad del parasitoide, mientras que para los restantes tratamientos (*Atacados vs Aire limpio* y *Atacados vs Sin daño*) las réplicas en las que el insecto permaneció inmóvil representan el 42% y 34%, respectivamente. Por un lado, dicha observación nos podría servir para evaluar la metodología utilizada y los resultados obtenidos, demostrando que la estimulación es percibida por el insecto. Asimismo, nos da la pauta de que la estimulación derivada directamente de su hospedero o resultantes de la herbivoría provocarían una mayor actividad en los parasitoides y responden de manera diferencial a ella.

Cabe mencionar que la metodología aquí utilizada, un olfatómetro de doble opción (tubo en Y), es un dispositivo de uso común en Ecología Química y de gran utilidad para evaluar el comportamiento de parasitoides microhimenópteros en base a dos o más fuentes odoríferas. No obstante, ha sido cuestionado en cuanto a la naturalidad del comportamiento exhibido de los organismos testados (Vet et al., 1983). Además, la actividad en el olfatómetro puede estar sujeta a la concentración de los estímulos utilizados, el flujo de aire y características intrínsecas de los insectos, entre otros aspectos (Ballhorn & Kautz, 2013).

Los resultados obtenidos para elección final y el tiempo de permanencia a favor del estímulo indican que los arándanos atacados son detectados y desencadenan una respuesta de orientación de las hembras de *T. anastrephae*. En ausencia de otros olores que interfieran en la percepción, al

ser comparado contra aire limpio, *T. anastrephae* discrimina sin ambigüedad la posición donde se encuentra un potencial hospedero y es orientado hacia él a través de la percepción de la información química procedente de la interacción entre estadios inmaduros de *D. suzukii* y los arándanos. Las diferencias observadas en la primera elección tomada por la avispa no son significantes entre la estimulación y su respectivo control para cada tratamiento, excepto para el tratamiento que incluía arándanos atacados por *D. suzukii* y aire limpio. En dicho tratamiento fue preferido el brazo del estímulo por sobre su control con diferencias significativas, lo que indicaría que los olores que se dependen de los arándanos atacados inducen un comportamiento de orientación y búsqueda más activo.

La posición de la avispa transcurridos los 300 segundos fue significativamente favorable al brazo por el que procede el estímulo para los tratamientos que contienen arándanos atacados por *D. suzukii*, por lo que, en términos generales, los resultados obtenidos de los ensayos de olfatometría muestran que las hembras de *T. anastrephae* tienden a preferir el brazo del dispositivo por donde proceden volátiles derivados de arándanos atacados por *D. suzukii*.

Un estudio previo realizado en nuestro laboratorio sugiere que el perfil de volátiles emitido por arándanos atacados por *D. suzukii* difiere en composición y cantidad de la mezcla liberada respecto a arándanos madurados naturalmente (de la Vega et al., 2020, en revisión). Esta diferencia odorífera parecería ser percibida y potencialmente informar sobre la posición del hospedero durante el proceso de búsqueda, lo cual resultaría en una búsqueda más activa por parte del parasitoide. La mezcla de volátiles liberada por los arándanos atacados se asemejaría cualitativamente al de la fruta sobre-madura (Farneti et al., 2015; de la Vega et al., 2020, en revisión). Dicho estado de la fruta es preferido por otras especies de *Drosophila*, las cuales posiblemente sean hospederos más habituales de *T. anastrephae*. Entonces, del ataque y desarrollo de los estadios inmaduros de *D. suzukii* en el interior de los arándanos resulta en información química perceptible a distancia por las hembras adultas de *T. anastrephae*. Visto que la colonización de los recursos por parte de *D. suzukii* se produce preferentemente de forma anticipada en relación a otras *Drosophila* (Mitsui et al., 2006; Atallah et al., 2014) y los parasitoides generalistas pueden ser versátiles en cuanto a la preferencia por hospederos en función de la abundancia en que se encuentren (Jaworski et al., 2013), la atracción de *T. anastrephae* hacia un sitio donde encuentra hospederos en los cuales puede desarrollarse y la relativa ausencia de hospederos alternativos (e.g., otras especies de *Drosophila* de incidencia más tardía) resultaría en una mayor presión del parasitoide sobre *D. suzukii*.

Las estrategias de orientación en la búsqueda de hospederos por parte de los parasitoides pueden ser respuestas innatas o haber sido adquiridas por la experiencia (Vet & Groenewold, 1990; Turlings et al., 1993; Hedlung et al., 1996; Biondi et al., 2017). Debido a que los insectos fueron criados en medios artificiales de cría en *D. melanogaster*, sin haber experimentado durante su desarrollo un contacto tanto con *D. sukii* ni con arándanos, así como tampoco en generaciones anteriores, la capacidad de reconocer los olores derivados de un posible hospedero o aquellos que resulten del desarrollo de los estadios que le preceden, podría ser una respuesta comportamental innata de las hembras *T. anastrephae*.

Variación periódica del comportamiento de búsqueda de sitios de oviposición

La preferencia por los arándanos atacados por *D. sukii* asociada con la búsqueda de su hospedero tiende a estar relacionada con la hora a lo largo del día. Las fases de luz y oscuridad son el principal modulador exógeno de los ritmos biológicos (Bell-Pedersen et al., 2005). La percepción de la variación temporal y la segregación temporal de procesos biológicos a nivel individual permite responder anticipadamente a las variaciones periódicas del ambiente y presenta un valor adaptativo para los organismos (Yerushalmi & Green, 2009).

Los resultados de esta tesina indicarían que la preferencia de *T. anastrephae* por el estímulo es mayoritaria en las primeras horas de la fase lumínica (09:00 a 12:00), disminuye hacia las horas centrales del día (12:00 a 15:00) y vuelve a incrementarse hacia las horas finales del día (15:00 a 18:00). El horario de realización de los ensayos fue el único parámetro variable durante la fase experimental, mientras que los restantes parámetros registrados fluctuaron en rangos acotados; la temperatura entre 21.5 a 24.9°C y la humedad entre 64.5 y 81.9%. La tendencia mencionada anteriormente es más evidente en el tratamiento que dispone arándanos atacados contra aire limpio (*Atacados vs Aire limpio*) respecto al tratamiento cuyo control es arándanos sin atacar (*Atacados vs Sin daño*). Es decir, los índices de preferencia (mayormente en órdenes de magnitud entre 0.5 y 1) muestran una tendencia hacia uno de los brazos del dispositivo a distintas horas del día, no así cuando se lo compara contra arándanos sin atacar (*Atacados vs Sin daño*), lo que podría indicar que la capacidad de percepción del parasitoide se ve reducida y no discierne la procedencia de los olores asociados o derivados de *D. sukii* del mismo modo que lo hace en ausencia de arándanos sin daño. No obstante, la posición final del tratamiento *Atacados vs Sin daño* en la mañana a favor del estímulo es significativa. A pesar de no mostrar ninguna preferencia en el tiempo de permanencia, parecería ser que con el transcurso del tiempo del ensayo logra descifrar la procedencia y tiende a posicionarse en el brazo del estímulo.

Si bien la metodología experimental no permite evidenciar la existencia de un ritmo circadiano, puesto que para ello los insectos deberían ser privados de la pista ambiental lumínica que modula los ritmos, se pudo demostrar la existencia de una variación a lo largo del día en el comportamiento de búsqueda de hospederos bajo las condiciones probadas. En un sistema tri-trófico cada componente posee inherentemente su ritmo biológico y puede haber un condicionamiento entre los distintos niveles, modulando el comportamiento del parasitoide con distinta intensidad (Zhang et al., 2010). Además, la presencia de microorganismos que contribuyen en el deterioro de la fruta también lo pueden hacer en el perfil de volátiles que está siendo detectado por la avispa (Vet & Dicke, 1992) y podrían impartir sus ritmos biológicos. En sistemas tri-tróficos, la sincronización de las emisiones de volátiles de la planta y de la actividad del parasitoides podría incrementar la defensa contra la herbivoría (Turlings & Erb, 2018).

A partir del conocimiento del patrón de preferencia hacia el estímulo en función del horario por parte del parasitoide se podría incrementar su eficiencia de control al restringir temporalmente los momentos de liberación de parasitoides (o aplicación de insecticidas) en un eventual uso de *T. anastrephae* como agente de control biológico de *D. suzukii*. La detección de la posición, el reconocimiento y la atracción hacia el hospedero a partir de la información química por parte del parasitoide es determinante en el ciclo biológico del grupo e imprescindibles para su uso como agentes controladores (Lewis et al., 1976; Vet & Dicke, 1992; Godfray, 1994). La orientación a distancia hacia la posición de su hospedero delimita el espacio de búsqueda a la planta que hospeda a su hospedero, incrementando las posibilidades de encuentro, de su reproducción y consecuentemente redundando en una mayor incidencia sobre las poblaciones de la especie plaga hospedera. El interés de este efecto inmediato para la agricultura es en términos de reducción directa de las especies que inciden negativamente sobre los cultivos y en la diferencia de productividad que resultaría de su ausencia.

8 Perspectivas

Esta tesina intenta colaborar en la resignificación de un grupo de insectos relegado en cuanto a estudio en Uruguay si consideramos el servicio ecosistémico que prestan como controladores de especies plaga y su potencialidad de ser aplicado a los sistemas agrícolas, disponiendo un abordaje alternativo para controlar una especie amenazante para el sector frutícola a nivel nacional y regional. El estudio de la interacción parasitoide-hospedero en un contexto tri-trófico, especialmente de la mediación de los semioquímicos en la interacción, permite potenciar la eficiencia de control de la plaga por parte de enemigos naturales a través de la manipulación más dirigida de la interacción tri-trófica.

El presente estudio es parte de una línea de investigación que ahondará en el estudio de microhimenópteros presentes en Uruguay capaces de parasitar y controlar a *D. suzukii*. La metodología utilizada ofrece una aproximación experimental de utilidad que puede ser aplicada para evaluar a otras especies de parasitoides. La relevancia radica en que, de observar controladores biológicos eficientes contra la plaga y de ser factible su cría en laboratorio, evitaría la necesidad de introducir nuevas especies a los ecosistemas del país y sus posibles consecuencias asociadas, con los recaudos ecológicos y la investigación detrás del posible impacto que podrían ocasionar.

9 Anexo

9.1 Consideraciones sobre el dispositivo de olfatometría (Tubo en Y)

El comportamiento es sumamente susceptible a múltiples factores interferentes, por lo tanto, su respuesta al entorno en condiciones naturales puede resultar más impredecible. Las condiciones en las que son evaluados los parasitoides en los dispositivos de olfatometría simplifican la complejidad natural en cuanto a la limpieza e intensidad de los olores ofrecidos y percibidos por los insectos. Las respuestas de los insectos a estímulos químicos pueden ser dependientes del contexto en el que son percibidos (Meiners, 2015). El “paisaje químico” en un entorno natural es más complejo. Además de la variabilidad en relación al grado de emisión y la composición, las fuentes de emisión se encuentran heterogéneamente distribuidas en el espacio, reduciendo la intensidad de los compuestos perceptibles e informativos por un efecto de dilución. A su vez, existen múltiples y diversas fuentes odoríferas que pueden interferir en la percepción de los compuestos de mayor relevancia para los parasitoides en la búsqueda de hospederos. Esta información volátil está sujeta a factores ambientales cambiantes (viento, temperatura, humedad, radiación, entre otros) y a la descomposición/transformación química de los compuestos. Las condiciones bajo las que fueron testados pueden distar de las condiciones naturales, principalmente por las fluctuaciones de las variables ambientales. Mediante esta técnica, el insecto se encuentra aislado de otros factores que pueden modular su comportamiento.

Un punto débil del tubo en Y para evaluar las preferencias a estímulos es que, en la zona neutra del dispositivo, el insecto recibe los olores del estímulo más diluidos cuando se utiliza aire limpio como control o mezclas de ambos brazos cuando del control procede información. Es decir, en los casos en los que se utiliza aire limpio como control del estímulo, cualitativamente permanece invariante la información perceptible por el insecto (de lo contrario, se produce una mezcla de compuestos), pero la estimulación disminuye en términos cuantitativos, lo que nos limita la capacidad de interpretación o qué tan preferido es el estímulo. De este modo, la preferencia es demostrada una vez que el insecto alcanza el punto de bifurcación del dispositivo, donde recibiría compuestos volátiles provenientes de una dirección a mayor intensidad.

9.2 Performance de *Trichopria anastrephae* sobre *Drosophila suzukii*

Para observar el grado de parasitismo de *T. anastrephae* se realizaron ensayos de parasitismo en pupas de *D. suzukii* sin opción. Se transfirieron larvas (L3) desde los tubos de cría hacia recipientes de vidrio con una cantidad de mínima de dieta artificial a base de maíz, a razón de cinco larvas por frasco para controlar la edad de la pupa. Las pupas de un día de edad fueron expuestas a una hembra adulta de *T. anastrephae* por 72 horas. Previo al ensayo de parasitismo las hembras del parasitoide fueron alimentadas con solución de agua y miel (50:50) y expuestas a machos entre 7 y 10 días post-eclosión. En total, el ensayo consistió de 45 frascos (225 pupas), 30 fueron incubados con *T. anastrephae* ($n = 150$) y los 15 restantes actuaron de control ($n = 75$). El ensayo se hizo en las condiciones de cría de *D. suzukii* (22 °C, 12:12 L:D y 65% de RH). Transcurridas las 72 horas, se retiraron los parasitoides. Los frascos fueron tapados con algodón, el cual era mínimamente humedecido cada dos días para evitar el resecado de las pupas y permitir que continúe el desarrollo del insecto (mosca o parasitoide). Diariamente a partir del décimo día se constató la emergencia de los insectos. Se determinó el número de individuos emergidos, el tiempo que tardaron en completar el desarrollo y el sexo. A partir de estos datos, se determinaron la tasa de parasitismo entendida como la reducción del porcentaje del número inicial de pupas de *D. suzukii* y el de natalidad de hembras de *T. anastrephae* con las siguientes fórmulas:

Porcentaje *D. suzukii* inicial = $(\text{Nro. de moscas} - \text{Nro. de parasitoides}) / \text{Nro. de moscas}$;

Tasa natalidad hembras *T. anastrephae* = $\text{Nro. parasitoides hembras} / \text{Nro. total de parasitoides}$.

El tiempo de desarrollo de *T. anastrephae* fue de 21 ± 1 días. El porcentaje de pupas atacadas muestra una reducción cercana a la mitad (52%) por parte de *T. anastrephae* sobre *D. suzukii*. Por su parte, el porcentaje o tasa de nacimientos de parasitoides hembras fue del 60% con una relación de fecundidad de casi tres nuevos individuos por cada hembra.

Si bien estos resultados son preliminares, muestran que (1) la población local de *T. anastrephae* criada en *D. melanogaster* (sin contacto previo con *D. suzukii*) puede completar su ciclo sobre *D. suzukii*, (2) al menos en laboratorio puede reducir un 50% la presión de *D. suzukii* y (3) puede generar una descendencia con posibilidades de establecerse en el nuevo lugar. Tales características preliminares ponen de manifiesto la importancia de desarrollar más estudios sobre el parasitoide que permitan entender cómo poner un freno a la plaga en la región.

9.3 Método de cría de parasitoides microhimenópteros

Se presenta un método de cría de parasitoides microhimenópteros utilizando como hospedero a *D. melanogaster* en condiciones de laboratorio con el propósito de su investigación. La siguiente metodología es aplicable a parasitoides de larva (*Leptopilina* spp.) y de pupa (*T. anastrephae* y *P. vindemmiae*) con ligeras variantes según el estadio hospedero de la avispa.

La cría de parasitoides comprende tres etapas: (1) Mantenimiento del cultivo de moscas para disponer de los estadios hospederos óptimos de cada parasitoide, (2) acondicionamiento de hembras adultas con su hospedero para que completen su ciclo biológico y (3) alimentación y apareamiento de los parasitoides previo a iniciar nuevamente el proceso de cría. En la figura 19 se resumen esquemáticamente dichas etapas.

(1) Las moscas *Drosophila* son criadas en tubos de vidrio (90 mm de alto y 27 mm de diámetro) con medios artificiales a base de maíz (504 mL de agua, 66 g de azúcar, 6 g de levadura de panadería, 2.3 g de agar, 52 g de harina de maíz, 1.3 mL de ácido propiónico, 0.8 g de nipagina). Los tubos contienen una cantidad de medio aproximada de 20-25 mm de alto y se mantienen a temperatura de heladera desde la preparación hasta su utilización (previamente templado a temperatura ambiente). El extremo libre de los tubos es tapado con algodón para evitar el cierre hermético y permitir el intercambio de aire.

Consideramos que *D. melanogaster* resulta más adecuada para la cría de parasitoides por ser más prolíficas en los medios artificiales utilizados y por la tendencia de las larvas a ascender por las paredes del tubo para empupar, quedando más expuestas y facilitando el acceso de los parasitoides a un mayor número de pupas.

(2) En la selección de los tubos en que serán sembrados los parasitoides se procura que contengan mayormente el estadio hospedero óptimo de las avispas. Este momento es, para el caso de los parasitoides de pupa (*T. anastrephae* y *P. vindemmiae*), a medida que se comienzan a observar pupas en la pared del tubo y se encuentra una buena proporción de larvas en estado avanzado del desarrollo (L3). Para el caso del parasitoide de larva (*Leptopilina* spp.), los tubos son seleccionados cuando se encuentran preferentemente larvas en los estados iniciales del desarrollo (L1). Se procede a remover los adultos presentes hacia un nuevo tubo con medio para continuar la cría de la mosca y se depositan hembras adultas de parasitoides, previamente apareadas y alimentadas con una solución de agua y miel (50:50), sean provenientes de colectas en campo o de una nueva generación del laboratorio, a razón de 5-10 individuos por tubo.

Para los parasitoides de larva, una vez removidos las moscas del tubo de cría, la porción de medio que contiene las larvas es fraccionada en partes equitativas (aproximadamente en tres fracciones) y colocadas en tubos de cría sin medio donde se introducirán hembras adultas de parasitoides. El motivo del fraccionamiento se debe al número de larvas por tubo que excede la posibilidad de ataque del parasitoide dada la habilidad de encapsular los huevos por parte del estadio larval a medida que progresa el desarrollo. Una opción alternativa para evitar la transferencia de medio con larvas entre tubos es utilizar tubos de cría que contengan un menor número de moscas, de esta forma se minimiza el número de larvas por tubo.

Acondicionados los parasitoides con sus hospederos y transcurridos aproximadamente 15-25 días, los tubos de cría se encuentran con un número disminuido o ausencia de moscas, el medio comienza a descomponerse y el color amarillento inicial adquiere colores más oscuros al momento de la emergencia de parasitoides adultos. En caso de fraccionar el medio de partida para los parasitoides de larva, es posible que se encuentre deshidratado para el momento que alcanzan el estadio adulto.

(3) A medida que emergen parasitoides son transferidos a matraces de 500 mL (previamente lavados y secados en estufa a 100 °C). Completado el pasaje de avispas, se coloca un tapón de algodón que sostiene una porción de algodón más pequeña embebida en una solución de agua destilada y miel (50:50) (procurando que no gotee) y el recipiente con los parasitoides es acondicionado en la incubadora. El algodón a través del cual se hidratan y alimentan las avispas se recambia diariamente.

Una vez que trascurren aproximadamente 48 horas desde que se alimentaron y fueron acondicionados ambos sexos en el mismo recipiente podemos volver a repetir el procedimiento de cría. De lo contrario, se debería continuar con la alimentación diaria y de esta manera se dispone de un stock de parasitoides por 20-30 días aproximadamente. A través de dietas a base de miel y agua destilada (50:50) para *T. anastrephae* se logra extender la longevidad de ambos sexos a 35.4 y 47.5 días para hembras y machos, respectivamente (Vieira et al., 2020b).

En el laboratorio, las crías de los insectos se mantienen en cámaras de incubación bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y fotoperiodo [22°C, 65% de RH, 12:12 L:D h]. En estas condiciones, el tiempo aproximado para completar el ciclo es de 12 días para las moscas y 25 días para los parasitoides.

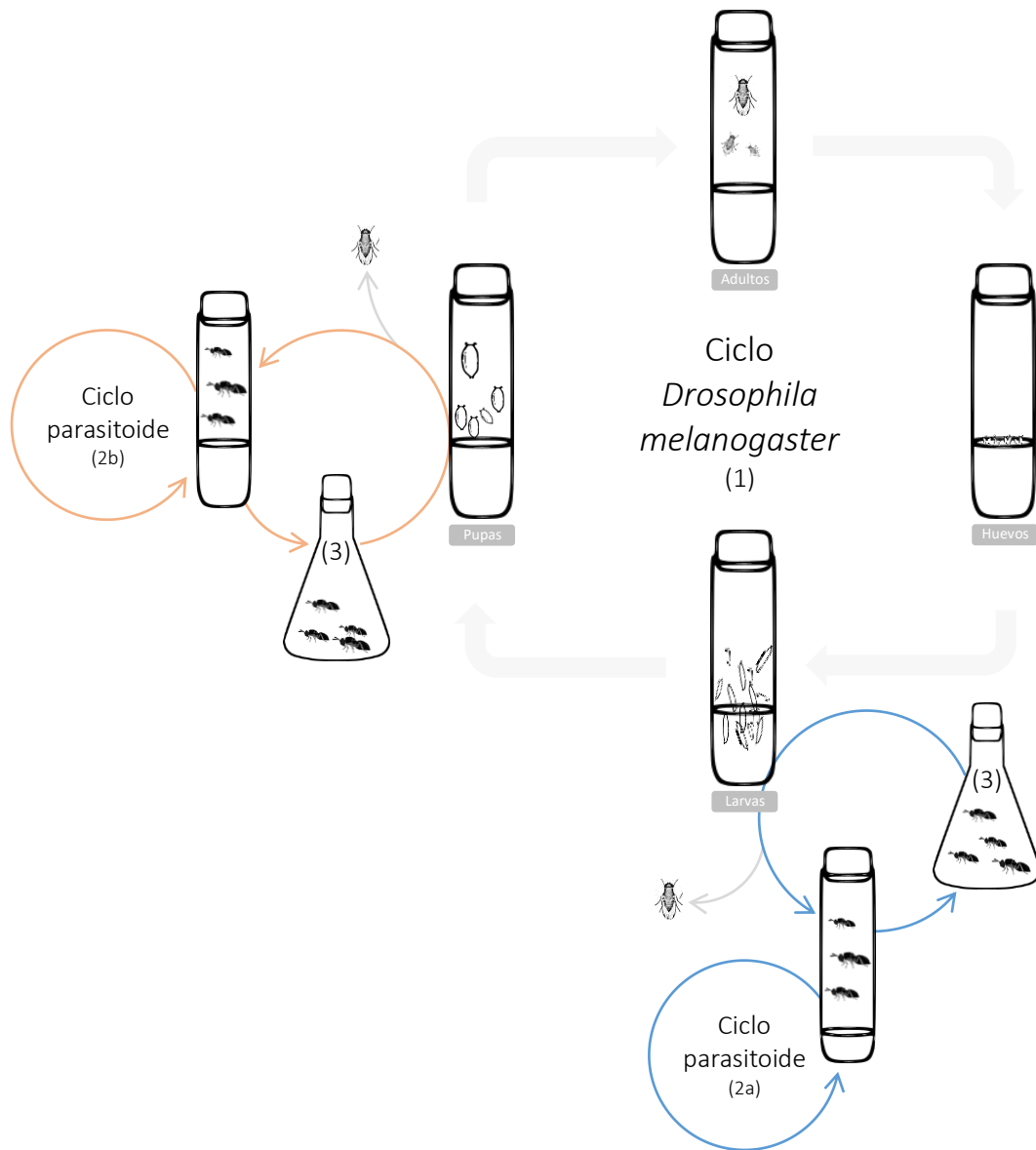


Figura 19. Esquema del procedimiento de cría de parasitoides microhimenópteros a partir de tubos de cría de *Drosophila melanogaster* (1); desde arriba y en sentido horario los estadios son: adultos, huevos, estadios larvales y pupas. (2) Ciclo de los parasitoides de larva (*Leptopilina* spp.) (2a) y de pupa (*Trichopria anastrephae* y *Pachycrepoideus vindemmiae*) (2b). (3) Almacenamiento y mantenimiento de parasitoides.

10 Bibliografía

- Abram, P. K., Brodeur, J., Burte, V., & Boivin, G. (2016). Parasitoid-induced host egg abortion: An underappreciated component of biological control services provided by egg parasitoids. *Biol. Control* 98, 52–60.
- Aguiar-Menezes, E. L., Menezes, E. B., Silva, P. S., Bittar, A. C., & Cassino, P. C. R. (2001). Native hymenopteran parasitoids associated with *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in Seropedica city, Río de Janeiro, Brazil. *Florida Entomologist*, 706-711.
- Andreazza, F., Bernardi, D., Dos Santos, R. S. S., Garcia, F. R. M., Oliveira, E. E., Botton, M., & Nava, D. E. (2017). *Drosophila suzukii* in southern neotropical region: current status and future perspectives. *Neotropical entomology*, 46(6), 591-605.
- Arias-Penna, T. M. (2003). Lista de los géneros y especies de la superfamilia Proctotrupoidea (Hymenoptera) de la región neotropical. *Biota Colombiana* 4(1): 3-32.
- Atallah, J., L. Teixeira, R. Salazar, G. Zaragoza, & Koppa. A. (2014). The making of a pest: the evolution of a fruit-penetrating ovipositor in *Drosophila suzukii* and related species. *Proceedings of the Royal Society B*. 281:20132840.
- Bal, H. K., Adams, C., & Grieshop, M. (2017). Evaluation of of-season potential breeding sources for spotted wing drosophila (*Drosophila suzukii* Matsumura) in Michigan. *J Econ Entomol* 110:2466–2470.
- Ballhorn, D. J., & Kautz, S. (2013). How useful are olfactometer experiments in chemical ecology research? *Communicative & integrative biology*, 6(4), e55602.
- Begon, M., Harper, J. L., & Townsend, C. R. (1986). *Ecology. Individuals, populations and communities*. Blackwell scientific publications.
- Bell-Pedersen, D., Cassone, V. M., Earnest, D. J., Golden, S. S., Hardin, P. E., Thomas, T. L., & Zoran, M. J. (2005). Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nature Reviews Genetics*, 6(7), 544-556.
- Benito, N. P., Lopes-da-Silva, M., & dos Santos, R. S. S. (2016). Potential spread and economic impact of invasive *Drosophila suzukii* in Brazil. *Pesquisa Agropecu ria Brasileira*, 51(5), 571-578.
- Bernardi, D., Ribeiro, L., Andreazza, F., Neitzke, C., Oliveira, E. E., Botton, M., Nava, D. E., & Vendramim, J. E. (2017). Potential use of Annona by products to control *Drosophila suzukii* and toxicity to its parasitoid *Trichopria anastrephae*. *Ind Crop Prod* 110:30–35.

Biondi, A., Wang, X., Miller, J. C., Miller, B., Shearer, P. W., Zappala, L., Siscaro, G., Walton, V. W., Hoelmer, K. A., & Daane, K. M. (2017). Innate olfactory responses of *Asobara japonica* toward fruits infested by the invasive spotted wing drosophila. *J Insect Behav* 30:495–506.

Biondi, A., Wang, X., & Daane, K. M. (2020). Host preference of three Asian larval parasitoids to closely related *Drosophila* species: implications for biological control of *Drosophila suzukii*. *Journal of Pest Science*, 1-11.

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.

Boscán de Martínez, N., & Godoy, F. (1996). New parasitoids from *Anastrepha* and *Ceratitis* fruit flies in Venezuela. *Agronomía Tropical (Venezuela)*, 46(4), 465-471.

Brown, W. L., Eisner, T., & Whitaker, R. H. (1970). Allomones and kairomones: transspecific chemical messengers. *Bioscience* 20:21–22.

Bruck, D. J., Bolda, M., Tanigoshi, L., Klick, J., Kleiber, J., Defrancesco, J., Gerdeman, B., & Spitler, H. (2011). Laboratory and field comparisons of insecticides to reduce infestation of *Drosophila suzukii* in berry crops. *Pest Manag Sci* 67:1375–1385.

Burrack, H. J., Asplen, M., Bahder, L., Collins, J., Drummond, F. A., Guedot, C., Isaacs, R., Johnson, D., Blanton, A., Lee, J. C., Loeb, G., Rodriguez-Saona, C., Van Timmeren, S., Walsh, D., & Mcphie, D. R. (2015). Multistate comparison of attractants for monitoring *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in blueberries and caneberries. *Environ Entomol* 44: 704–712

CABI (2020). *Drosophila suzukii* (spotted wing drosophila). In: *Invasive Species Compendium*. Wallingford, UK: CAB International. www.cabi.org/isc.

Calabria, G., Máca, J., Bächli, G., Serra, L., & Pascual, M. (2012). First records of the potential pest species *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in Europe. *Journal of Applied entomology*, 136(1-2), 139-147.

Carmona, D., Fitzpatrick, C. R., & Johnson, M. T. (2015). Fifty years of co-evolution and beyond: integrating co-evolution from molecules to species. *Molecular Ecology*, 24(21), 5315-5329.

Carton, Y., Bouletreau, M., Van Lenteren, J. C., & Van Alphen, J. C. M. (1986). The *Drosophila* parasitic wasps. In: *The Genetics and biology of Drosophila*, M. Ashburner, HL Carson, and JN Thompson.

Carton, Y., & Nappi, A. J. (1997). *Drosophila* cellular immunity against parasitoids. *Parasitology today*, 13(6), 218-227.

Chabert, S., Allemand, R., Poyet, M., Eslin, P., & Gibert, P. (2012). Ability of European parasitoids (Hymenoptera) to control a new invasive Asiatic pest, *Drosophila suzukii*. *Biological Control*, 63(1), 40-47.

Chen, C., He, X., Zhou P., & Wang, O. (2020). *Tamarixia triozae*, an important parasitoid of *Bactericera cockerelli*: circadian rhythms and their implications in pest management. *BioControl*.

Cini, A., Anfora, G., Escudero-Colomar, L. A., Grassi, A., Santosuosso, U., Seljak, G., & Papini, A. (2014). Tracking the invasion of the alien fruit pest *Drosophila suzukii* in Europe. *Journal of Pest Science*, 87(4), 559-566.

Cini, A., Ioriatti, C., & Anfora, G. (2012). A review of the invasion of *Drosophila suzukii* in Europe and a draft research agenda for integrated pest management.

Cloyd, R. A. (2012). Indirect effects of pesticides on natural enemies. *Pesticides—Advances in Chemical and Botanical Pesticides*, 382.

Cook, D. C., Fraser, R. W., Paini, D. R., Warden, A. C., Lonsdale, W. M., & De Barro, P. J. (2011). Biosecurity and yield improvement technologies are strategic complements in the fight against food insecurity. *PLoS One*, 6(10), e26084.

Cormier, D., Veilleux, J., & Firlej, A. (2015). Exclusion net to control spotted wing *Drosophila* in blueberry fields. *IOBC-WPRS Bull*, 109, 181-184.

Cruz, P. P., Neutzling, A. S., & Garcia, F. R. M. (2011). Primeiro registro de *Trichopria anastrephae*, parasitoide de moscas-das-frutas, no Rio Grande do Sul. *Ciência Rural*, 41(8), 1297-1299.

Daane, K. M., Wang, X. G., Biondi, A., Miller, B., Miller, J. C., Riedl, H., et al. (2016). First exploration of parasitoids of *Drosophila suzukii* in South Korea as potential classical biological agents. *Journal of pest science*, 89(3), 823-835.

De Bach, P. (1964). Biological control of insect pests and weeds. *Biological control of insect pests and weeds*.

De Camargo, R., & Phaff, H. J. (1957). Yeasts occurring in *Drosophila* flies and in fermenting tomato fruits in Northern California. *Journal of food science*, 22(4), 367-372.

Dent, D., & Binks, R. H. (2020). *Insect pest management*. Cabi.

De la Vega, G. J., Corley, J. C., & Soliani, C. (2020). Genetic assessment of the invasion history of *Drosophila suzukii* in Argentina. *Journal of Pest Science*, 93(1), 63-75.

De la Vega, G. J., Triñanes, F., & González, A. (2020, en revisión). Effect of *Drosophila suzukii* on blueberry VOCs: chemical cues for a pupal parasitoid, *Trichopria anastrephae* (Hymenoptera: Diapriidae).

De Moraes, C. M., Lewis, W. J., Pare, P. W., Alborn, H. T., & Tumlinson, J. H. (1998). Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature*, 393(6685), 570-573.

Deprá, M., Poppe, J. L., Schmitz, H. J., De Toni, D. C., & Valente, V. L. (2014). The first records of the invasive pest *Drosophila suzukii* in the South American continent. *Journal of Pest Science*, 87(3), 379-383.

De Santis, L. (1980). *Catálogo de los himenopteros brasileños de la serie Parasítica, incluyendo Bethyloidea*. Editora da Universidade Federal do Paraná.

Dicke, M., & Baldwin, I. T. (2010). The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the 'cry for help'. *Trends in plant science*, 15(3), 167-175

Dicke, M., Sabelis, M. W., Takabayashi, J., Brain, J., & Posthumus, M. A. (1990). Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals: prospects for application in pest control. *Journal of Chemical Ecology* 16:3091-3118.

Didham, R. K., Tylianakis, J. M., Hutchison, M. A., Ewers, R. M., & Gemmell, N. J. (2005). Are invasive species the drivers of ecological change? *Trends in ecology & evolution*, 20(9), 470-474.

Dos Santos, L. A., Mendes, M. F., Krüger, A. P., Blauth, M. L., Gottschalk, M. S., & Garcia, F. R. (2017). Global potential distribution of *Drosophila suzukii* (Diptera, Drosophilidae). *PLoS One*, 12(3), e0174318.

Eggleton, P., & Belshaw, R. (1992). Insect parasitoids: an evolutionary overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 337(1279), 1-20.

Ehler, L. E. (2006). Integrated pest management (IPM): definition, historical development and implementation, and the other IPM. *Pest management science*, 62(9), 787-789.

Eisner, T., & Meinwald, J. (1995). Chemical ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(1), 1.

Entling, W., Anslinger, S., Jarausch, B., Michl, G., & Hofmann, C. (2019). Berry skin resistance explains oviposition preferences of *Drosophila suzukii* at the level of grape cultivars and single berries. *Journal Pest Science* 92:477–484.

Farneti, B., Khomenko, I., Grisenti, M., Ajelli, M., Betta, E., Algarra, A. A., Capellin, L., Aprea, E., Gasperi, F., Biasioli, F., & Giongo, L. (2017). Exploring blueberry aroma complexity by chromatographic and direct-injection spectrometric techniques. *Frontiers in plant science*, 8, 617.

Felton, G. W., & Tumlinson, J. H. (2008). Plant–insect dialogs: complex interactions at the plant–insect interface. *Current opinion in plant biology*, 11(4), 457-463.

Fontes, J., Roja, I. S., Tavares, J., & Oliveira, L. (2018). Lethal and sublethal effects of various pesticides on *Trichogramma achaeae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Journal of Economic Entomology*. 111, 1219–1226.

Gabarra, R., Riudavets, J., Rodríguez, G. A., Pujade-Villar, J., & Arnó, J. (2015). Prospects for the biological control of *Drosophila suzukii*. *BioControl*, 60(3), 331-339.

Gandhi, K. J., & Herms, D. A. (2010). Direct and indirect effects of alien insect herbivores on ecological processes and interactions in forests of eastern North America. *Biological Invasions*, 12, 389–405.

Garcia, F. R. M., & Corseuil, E. (2004). Native hymenopteran parasitoids associated with fruit flies (Diptera: Tephritoidea) in Santa Catarina State, Brazil. *Florida Entomologist*, v.87, n.4, p.517-521

Gatehouse, J. A. (2002). Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New phytologist*, 156(2), 145-169.

Giorgini, M., Wang, X. G., Wang, Y., Chen, F. S., Hougardy, E., Zhang, H. M., et al. (2019). Exploration for native parasitoids of *Drosophila suzukii* in China reveals a diversity of parasitoid species and narrow host range of the dominant parasitoid. *Journal of Pest Science*, 92(2), 509-522.

Godfray, H. C. J. (1994). *Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology* (Vol. 67). Princeton University Press.

Goodhue, R. E., Bolda, M., Farnsworth, D., Williams, J. C., & Zalom, F. G. (2011). Spotted wing drosophila infestation of California strawberries and raspberries: economic analysis of potential revenue losses and control costs. *Pest management science*, 67(11), 1396-1402.

González, G., Mary, A. L., & Goñi, B. (2015). *Drosophila suzukii* (Matsumura) found in Uruguay. *Drosoph Inf Serv*, 98, 103-107.

Greathead, D. J. (1986). Parasitoids in classical biological control. In *Insect parasitoids*. 13th Symposium of the Royal Entomological Society of London, 18-19 September 1985 at the Department of Physics Lecture Theatre, Imperial College, London (pp. 289-318). Academic Press.

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.

Hamby, K. A., Kwok, R. S., Zalom, F. G., & Chiu, J. C. (2013). Integrating circadian activity and gene expression profiles to predict chronotoxicity of *Drosophila suzukii* response to insecticides. *PLoS ONE* 8:e68472

Hardin, J. A., Kraus, D. A., & Burrack, H. J. (2015). Diet quality mitigates intraspecific larval competition in *Drosophila suzukii*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 156: 59–65.

Harvey, J. A., Biere, A., Fortuna, T., Vet, L. E., Engelkes, T., Morriën, E., Gols, R., Verhoeven, K., Vogel, H., & Macel, M. (2010). Ecological fits, mis-fits and lotteries involving insect herbivores on the invasive plant, *Bunias orientalis*. *Biological Invasions*, 12, 3045–3059.

Hassell, M. (2000). The spatial and temporal dynamics of host-parasitoid interactions. OUP Oxford.

Hauser, M. (2011). A historic account of the invasion of *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae) in the continental United States, with remarks on their identification. *Pest Management Science*, 67(11):1352-1357.

Haviland, D. R., & Beers, E. H. (2012). Chemical control programs for *Drosophila suzukii* that comply with international limitations on pesticide residues for exported sweet cherries. *Journal of Integrated Pest Management*, 3(2), F1-F6.

Hawkins, B. A., Cornell, H. V., & Hochberg, M. E. (1997). Predators, parasitoids, and pathogens as mortality agents in phytophagous insect populations. *Ecology*, 78(7), 2145-2152.

Hedlund, K., Vet, L. E., & Dicke, M. (1996). Generalist and specialist parasitoid strategies of using odours of adult drosophilid flies when searching for larval hosts. *Oikos*, 390-398.

Heil, M. (2008). Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist*, 178(1), 41-61.

Herrera C. M., & Pellmyr O. (2002). Plant-animal interactions. Oxford: Blackwell Science.

Huggert, L., & Masner, L. (1983). A review of myrmecophilic symphilic diapiiid wasps in the holarctic realm, with description of new taxa and a key to genera (Hymenoptera: Proctotrupoidea: Diapiiidae). *Contributions Amer. Entomol. Institute* 20, 63–89.

Hunter, M. D., & Price, P. W. (1992). Playing chutes and ladders: heterogeneity and the relative roles of bottom-up and top-down forces in natural communities. *Ecology*, 724-732.

IBO (International Blueberry Organization). (2020). Disponible en: <https://www.internationalblueberry.org>

Iglesias, L. E., & Liburd, O. E. (2017). The effect of border sprays and between-row soil tillage on *Drosophila suzukii* in organic blackberry production. *Journal of Applied Entomology*, 141(1-2), 19-27.

Ioriatti, C., Anfora, G., Tasin, M., De Cristofaro, A., Witzgall, P., & Lucchi, A. (2011). Chemical ecology and management of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Economic Entomology*, 104(4), 1125-1137.

Ioriatti, M. C. S. S. (1995). Contribuição ao estudo da biologia e taxonomia de Hymenoptera parasitóides de Diptera das famílias Tephritidae e Lonchaeidae. 1995. 124f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade Federal de São Carlos, SP.

Jaramillo, S. L., Mehlferber, E., & Moore, P. J. (2015). Life-history tradeoffs under different larval diets in *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *Physiological Entomology* 40: 2–9.

Jaworski, C. C., Bompard, A., Genies, L., Amiens-Desneux, E., & Desneux, N. (2013). Preference and prey switching in a generalist predator attacking local and invasive alien pests. *PLoS One*, 8(12), e82231.

Jeschke, J. M., & Heger, T. (Eds.). (2018). *Invasion biology: hypotheses and evidence* (Vol. 9). CABI.

Kacsoh, B. J., & Schlenke, T. A. (2012). High hemocyte load is associated with increased resistance against parasitoids in *Drosophila suzukii*, a relative of *D. melanogaster*. *PLoS ONE*, 7, e34721.

Kalt, W., Cassidy, A., Howard, L. R., Krikorian, R., Stull, A. J., Tremblay, F., & Zamora-Ros, R. (2020). Recent research on the health benefits of blueberries and their anthocyanins. *Advances in Nutrition*, 11(2), 224-236.

Kanzawa, T. (1935). Research into the Fruit-fly *Drosophila suzukii* Matsumura (Preliminary Report). Yamanashi Prefecture Agricultural Experiment Station, Kofu, Japan.

Kanzawa, T. (1939). Studies on *Drosophila suzukii* Mats. Yamanashi Agricultural Experimental Station, Kofu, Japan.

Kaser, J. M., Nielsen, A. L., & Abram, P. K. (2018). Biological control effects of non-reproductive host mortality caused by insect parasitoids. *Ecol. Appl.* 28, 1081–1092.

Kawase, S., Uchino, K., Yasuda, M., & Motoori, S. (2008). Netting control of cherry *Drosophila*, *Drosophila suzukii* injurious to blueberry. *Bull Chiba Prefect Agric Res Cent* 7:9–15.

Kenis, M., Auger-Rozenberg, M. A., Roques, A., Timms, L., Pere, C., Cock, M. J., Settele, J., Augustin, S., & Lopez-Vaamonde, C. (2009). Ecological effects of invasive alien insects. *Biological Invasions*, 11, 21–45.

Kenis, M., Tonina, L., Eschen, R., van der Sluis, B., Sancassani, M., Mori, N., Haye, T., & Helsen, H. (2016). Non-crop plants used as hosts by *Drosophila suzukii* in Europe. *J Pest Sci* 89:735–748.

Khan, Z. R., James, D. G., Midega, C. A., & Pickett, J. A. (2008). Chemical ecology and conservation biological control. *Biological control*, 45(2), 210-224.

Kinjo, H., Kunimi, Y., & Nakai, M. (2014). Effects of temperature on the reproduction and development of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *Appl Entomol Zool* 49:297–304.

Kogan, M. (1998). Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. *Annu. Rev. Entomol.* 43, 243-270.

Krüger, A. P., Scheunemann, T., Garcez, A. M., Bernardi, D., Nava, D. E., & Garcia, F. R. M. (2019). Ritmo de Emergência de *Trichopria anastrephae* Criados em Pupários de *Drosophila suzukii*. In Embrapa Clima Temperado-Resumo em anais de congresso (ALICE). In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 16., 2019, Londrina. Controle biológico: da academia ao campo, rumo à sustentabilidade: anais. Londrina: Sociedade Entomológica do Brasil, 2019.

Labandeira, C. C., & Sepkoski, J. J. (1993). Insect diversity in the fossil record. *Science*, 261(5119), 310-315.

Lantschner, M. V., de la Vega, G.J., & Corley J. (2019). Modelling the establishment, spread and distribution shifts of pests.

Lauyó, M. L. A. (2017). Diversidad de Drosophilidae (Díptera) 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).

Lavine, M. D., & Strand, M. R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 1295–1309.

Law, J. H., & Regnier, F. E. (1971). Pheromones. *Annual review of biochemistry*, 40(1), 533-548.

Lee, J. C., Bruck, D. J., Curry, H., Edwards, D., Haviland, D. R., Van Steenwyk, R. A., & Yorgey, B. M. (2011a). The susceptibility of small fruits and cherries to the spotted-wing drosophila, *Drosophila suzukii*. *Pest Manag Sci* 67:1358–1367. doi:10.1002/ps.2225

Lee, J. C., Bruck, D. J., Dreves, A. J., Ioriatti, C., Vogt, H., & Baufeld, P. (2011b). In focus: spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii*, across perspectives. *Pest Manag Sci* 67:1349–1351.

Lee, J. C., Dreves, A. J., Cave, A. M., Kawai, S., Isaacs, R., Miller, J. C., Van Timmeren, S., & Bruck, D. J. (2015). Infestation of wild and ornamental noncrop fruits by *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *Ann Entomol Soc Am* 108:117–129.

Letourneau, D. K., Jedlicka, J. A., Bothwell, S. G., & Moreno, C. R. (2009). Effects of natural enemy biodiversity on the suppression of arthropod herbivores in terrestrial ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40, 573-592.

Lewis, W. J., Jones, R. L., Gross, Jr. H. R., & Nordlund, D. A. (1976). The role of kairomones and other behavioral chemicals in host finding by parasitic insects. *Behavioral Biology*, 16(3), 267-289.

Lima, A. C. (1940). Alguns parasitos de moscas de frutas. Anais da Academia Brasileira de Ciência, v.12, n.1, p.17-20.

Loiácono, M. S., Margaría, C. B., & Aquino, D. A. (2013). Diapriinae wasps (Hymenoptera: Diaprioidea: Diapriidae) associated with ants (Hymenoptera: Formicidae) in Argentina. Psyche, 2013.

Louda, S. M., Arnett, A. E., Rand, T. A., & Russell, F. L. (2003). Invasiveness of some biological control insects and adequacy of their ecological risk assessment and regulation. Conservation biology, 17(1), 73-82.

Losey, J. E., & Vaughan, M. (2006). The economic value of ecological services provided by insects. Bioscience, 56(4), 311-323.

Marchiori, C. H., & Penteado-Dias, A. M. (2001). *Trichopria anastrephae* (Hymenoptera: Diapriidae), parasitóide de Diptera, coletadas em área de mata nativa e pastagem em Itumbiara, Goiás, Brasil. Arquivos do Instituto Biológico, v.68, n.1, p.123-124.

Masson, C., & Mustaparta, H. (1990). Chemical information processing in the olfactory system of insects. Physiol. Rev. 70:199-245.

Masner, L. (2006). Diapriidae. En: Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical. Fernández, F. & M. J. Sharkey (eds). Sociedad Colombiana de Entomología y Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, pp. 615-618.

Meiners, T. (2015). Chemical ecology and evolution of plant–insect interactions: a multitrophic perspective. Current Opinion in Insect Science, 8, 22–28. doi:10.1016/j.cois.2015.02.003

Medina-Muñoz, M. C., Lucero, X., Severino, C., Cabrera, N., Olmedo, D., Del Pino, F., Alvarez, E., Jara, C., & Godoy-Herrera, R. (2015). *Drosophila suzukii* arrived in Chile. Dros Inf Serv 98(23):136–137.

Miranda, M., Sivinski, J., Rull, J., Cicero, L., & Aluja, M. (2015). Niche breadth and interspecific competition between *Doryctobracon crawfordi* and *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), native and introduced parasitoids of *Anastrepha* spp. fruit flies (Diptera: Tephritidae). Biological Control, 82, 86-95.

Mitsui, H., Beppu, K., & Kimura, M. T. (2010). Seasonal life cycles and resource uses of flower-and fruit-feeding drosophilid flies (Diptera: Drosophilidae) in central Japan. Entomological Science, 13(1), 60-67.

Mitsui, H., Takahashi, K. H., & Kimura, M. T. (2006). Spatial distributions and clutch sizes of *Drosophila* species ovipositing on cherry fruits of different stages. *Population Ecology*, 48(3), 233-237.

Moore, J. N. (1993). In The Blueberry Industry of North America. In ISHS Acta Horticulturae 346: V International Symposium on *Vaccinium* Culture; International Society for Horticultural Science; pp 15–26.

Mumm, R., & Dicke, M. (2010). Variation in natural plant products and the attraction of bodyguards involved in indirect plant defense. *Canadian journal of zoology*, 88(7), 628-667.

Murdoch, W. W. (1969). Switching in general predators: experiments on predator specificity and stability of prey population. *Ecol Monogr* 39:335–354.

Niinemets, Ü., Kännaste, A., & Copolovici, L. (2013). Quantitative patterns between plant volatile emissions induced by biotic stresses and the degree of damage. *Frontiers in Plant Science*, 4, 262.

Nordlund, D. A., & Lewis, W. J. (1976). Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. *Journal of Chemical Ecology*, 2(2), 211-220.

Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144, 31.

Ovruski, S., Aluja, M., Sivinski, J., & Wharton, R. (2000). Hymenopteran parasitoids on fruit-infesting Tephritidae (Diptera) in Latin America and the southern United States: diversity, distribution, taxonomic status and their use in fruit fly biological control. *Integrated Pest Management Reviews*, 5(2), 81-107.

Ovruski, S. M., Schliserman, P., & Aluja, M. (2004). Indigenous parasitoids (Hymenoptera) attacking *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in native and exotic host plants in Northwestern Argentina. *Biological Control*, 29(1), 43-57.

Paini, D. R., Sheppard, A. W., Cook, D. C., De Barro, P. J., Worner, S. P., & Thomas, M. B. (2016). Global threat to agriculture from invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(27), 7575-7579.

Panda, S., Hogenesch, J. B., & Kay, S. A. (2002). Circadian rhythms from flies to human. *Nature*, 417(6886), 329-335.

Parker, I. M., Simberloff, D., Lonsdale, W. M., Goodell, K., Wonham, M., Kareiva, P. M., Williamson, M. H., Von Holle, B., Moyle, P. B., Byers, J. E., & Goldwasser, L. (1999). Impact: toward a framework for understanding the ecological effects of invaders. *Biol. Invasions* 1:3-19

Parra, J. R. P., Botelho, P. S. M., Corrêa-Ferreira, B. S., & Bento, J. M. S. (2002). Controle biológico: uma visão inter e multidisciplinar. Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. São Paulo: Manole, 125-142.

Pearson, D. E., & Callaway, R. M. (2005). Indirect nontarget effects of host-specific biological control agents: implications for biological control. *Biological Control*, 35, 288–298.

Pittendrigh, C. S. (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 25, pp. 159-184). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Powell, W., & Poppy, G. (2001). Host location by parasitoids. *Insect Movement: Mechanisms and Consequences*. CAB International, Wallingford, UK, 111-129.

Power, A. G. (2010). Ecosystem services and agriculture: tradeoffs and synergies. *Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences*, 365(1554), 2959-2971.

Poyet, M., Havard, S., Prevost, G., Chabrierie, O., Doury, G., Gibert, P., & Eslin, P. (2013). Resistance of *Drosophila suzukii* to the larval parasitoids *Leptopilina heterotoma* and *Asobara japonica* is related to haemocyte load. *Physiological Entomology*, 38(1), 45-53.

Poyet, M., Le Roux, V., Gibert, P., Meirland, A., Prévost, G., Eslin, P., & Chabrierie, O. (2015). The wide potential trophic niche of the Asiatic fruit fly *Drosophila suzukii*: the key of its invasion success in temperate Europe? *PloS one*, 10(11), e0142785.

Price, P. W., Bouton, C. E., Gross, P., McPherson, B. A., Thompson, J. N., & Weis, A. E. (1980). Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11:41-65.

Price, P. W. (1984). *Insect ecology*. Second edition. Wiley Interscience, New York, New York, USA.

Pszczolkowski, M. A., Dobrowolski, M., & Spencer, C. (2004). When did you last test your insects? The forgotten importance of chronotoxicology. *American Entomologist*, 50(2), 72-75.

Quicke, D. L. (1997). *Parasitic wasps*. Chapman & Hall Ltd.

R Core Development Team (2019). *R: a language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.

Renkema, J. M., Wright, D., Buitenhuis, R., & Hallett, R. H. (2016). Plant essential oils and potassium metabisulfite as repellents for *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *Scientific Reports*, 6(1), 1-10.

Rombaut, A., Guilhot, R., Xuereb, A., Benoit, L., Chapuis, M. P., Gibert, P., & Fellous, S. (2017). Invasive *Drosophila suzukii* facilitates *Drosophila melanogaster* infestation and sour rot outbreaks in the vineyards. *Royal Soc Open Sci* 4:170-117.

Rossi Stacconi, M. V., Grassi, A., Dalton, D. T., Miller, B., Ouantar, M., Loni, A., Ioriatti, C., Walton, V. M., & Anfora, G. (2013). First field records of *Pachycrepoideus vindemiae* as a parasitoid of *Drosophila suzukii* in European and Oregon small fruit production areas.

Rossi Stacconi, M. V., Grassi, A., Ioriatti, C., & Anfora, G. (2018). Augmentative releases of *Trichopria drosophilae* for the suppression of early season *Drosophila suzukii* populations. *BioControl*, 64(1), 9-19.

Roubos, C. R., Rodriguez-Saona, C., Holdcraft, R., Mason, K. S., & Isaacs, R. (2014). Relative toxicity and residual activity of insecticides used in blueberry pest management: mortality of natural enemies. *J. Econ. Entomol.* 107, 277-285.

Santadino, M. V., Virgala, M. B. R., Bruno, M., Di Silvestro, G., & Lunazzi, E. G. (2015). First record of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in blueberry (*Vaccinium* spp.) from Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 74(3-4).

Santoiemma, G., Tonina, L., Marini, L., Duso, C., & Mori, N. (2020). Integrated management of *Drosophila suzukii* in sweet cherry orchards. *Entomol Gen* in press.

Santoiemma, G., Trivellato, F., Caloi, V., Mori, N., & Marini, L. (2019). Habitat preference of *Drosophila suzukii* across heterogeneous landscapes. *J Pest Sci* 92:485–494.

Sasaki, M., & Sato, R. (1995). Bionomics of the cherry drosophila, *Drosophila suzukii* Matsumura (Diptera: Drosophilidae) in Futeushima prefecture (Japan). *Annual Report of the Society of Plant Protection of North Japan*, 46: 164–172.

Sasaki, M., & Sato, R. (1996). Bionomics of *Drosophila pulchrella* Tan, Hus et Sheng (Diptera: Drosophilidae) in Fukushima prefecture (Japan). *Tohoku Agriculture Research*, 49: 161–162.

Schönrogge, K., Begg, T., Williams, R., Melika, G., Randle, Z., & Stone, G. N. (2012). Range expansion and enemy recruitment by eight alien gall wasp species in Britain. *Insect Conservation and Diversity*, 5(4), 298-311.

Seastedt, T. R., & Crossley, Jr. D. A. (1984). The influence of arthropods on ecosystems. *Bioscience*, 34(3), 157-161.

Schlesener, D. C. H., Wollmann, J., Pazini, J. B., Padilha, A. C., Grützmacher, A. D., & Garcia, F. R. M. (2019). Insecticide toxicity to *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae)

parasitoids: *Trichopria anastrephae* (Hymenoptera: Diapriidae) and *Pachycrepoideus vindemmiae* (Hymenoptera: Pteromalidae). J. Econ. Entomol 112, 1197–1206.

Schoener, T. W. (1989). Food webs from small to the large. Ecology 70:1559-1589.

Schoonhoven, L. M., Van Loon, B., van Loon, J. J., & Dicke, M. (2005). Insect-plant biology. Oxford University Press on Demand.

Sharkey, M. J. (2007). Phylogeny and classification of Hymenoptera. Zootaxa 1668: 521- 548.

Shaw, B., Brain, P., Wijnen, H., & Fountain, M. T. (2018). Reducing *Drosophila suzukii* emergence through inter-species competition. Pest Manag Sci 74:1466–1471.

Shawer, R., Tonina, L., Tirello, P., Duso, C., & Mori, N. (2018). Laboratory and field trials to identify effective chemical control strategies for integrated management of *Drosophila suzukii* in European cherry orchards. Crop Protection, 103, 73-80.

Silva, C. G., Marchiori, C. H., Fonseca, A. R., & Torres, L. C. (2003). Himenópteros parasitóides de larvas de *Anastrepha* spp. em frutos de carambola (*Averrhoa carambola* L.) na região de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil. Ciência e Agrotecnologia, 27(6), 1264-1267.

Silva-Soares, N. F., Nogueira-Alves, A., Beldade, P., & Mirth, C. K. (2017). Adaptation to new nutritional environments: larval performance, foraging decisions, and adult oviposition choices in *Drosophila suzukii*. BMC Ecol.

Smith, R. F., & Reynolds, H. T. (1966) Principles, definitions and scope of integrated pest control. Proceedings of FAO (United Nations Food and Agriculture Organization) Symposium on Integrated Pest Control 1, 11–17.

Soots, K., Krikmann, O., Starast, M., & Olt, J. (2017). Determining the dimensional characteristics of blueberries. Agronomy Research, 15(3), 886-896.

Stewart, T. J., Wang, X. G., Molinar, A., & Daane, K. M. (2014). Factors limiting peach as a potential host for *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). J Econ Entomol 107:1771–1779.

Stork, N. E. (2018). How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on Earth? Annual review of entomology, 63, 31-45.

Strauss, S. Y. (1991). Indirect effects in community ecology: their definition, study and importance. Trends in Ecology and Evolution 6:202-2 10.

Strik, B. (2006). Blueberry Production and Research Trends in North America. In ISHS Acta Horticulturae 715: VIII International Symposium on *Vaccinium* Culture; International Society for Horticultural Science; pp 173–183.

Tait, G., Cabianca, A., Grassi, A., Pfab, F., Oppedisano, T., Puppato, S., Mazzoni, V., Anfora, G., & Walton, V. (2020). *Drosophila suzukii* daily dispersal between distinctly different habitats. *Entomol Gen* 40:25–47.

Takamori, H., Watabe, H., Fuyama, Y., Zhang, Y., & Aotsuka, T. (2006). *Drosophila subpulchrella*, a new species of the *Drosophila suzukii* species subgroup from Japan and China (Diptera: Drosophilidae). *Entomological Science*, 9: 121- 128.

Thacker, J. R. M., & Train, M. R. (2010). Use of volatiles in pest control. *The chemistry and biology of volatiles*, 151-172.

Timms, L. L., Walker, S. C., & Smith, S. M. (2012). Establishment and dominance of an introduced herbivore has limited impact on native host-parasitoid food webs. *Biological Invasions*, 14, 229–244.

Tochen, S., Dalton, D. T., Wiman, N. G., Hamm, C., Shearer, P. W., & Walton, V. M. (2014). Temperature-related development and population parameters for *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) on cherry and blueberry. *Environ Entomol* 43:501–510.

Turica, A., & Mallo, R. G. (1961). Observaciones sobre la población de las “Tephritidae” y sus endoparásitos en algunas regiones citrícolas argentinas. *Revista IDIA, Supl*, 6, 145-161.

Turlings, T. C., & Erb, M. (2018). Tritrophic interactions mediated by herbivore-induced plant volatiles: mechanisms, ecological relevance, and application potential. *Annual review of entomology*, 63, 433-452.

Turlings, T. C., Tumlinson, J. H., Heath, R. R., Proveaux, A. T., & Doolittle, R. E. (1991). Isolation and identification of allelochemicals that attract the larval parasitoid, *Cotesia marginiventris* (Cresson), to the microhabitat of one of its hosts. *Journal of chemical ecology*, 17(11), 2235-2251.

Turlings, T. C., Tumlinson, J. H., & Lewis, W. J. (1990). Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science*, 250(4985), 1251-1253.

Turlings, T. C., Wäckers, F. L., Vet, L. E., Lewis, W. J., & Tumlinson, J. H. (1993). Learning of host-finding cues by hymenopterous parasitoids. In *Insect learning* (pp. 51-78). Springer, Boston, MA.

Vander Kloet, S.P. (1988). *The Genus Vaccinium in North America*. Ottawa: Agric. Can.

Vandermeer, J., Hazlett, B., & Rathcke, B. (1985). Indirect facilitation and mutualism. Pages 326-343 in D. H. Boucher, editor. *The biology of mutualism, ecology and evolution*. Oxford University Press, Oxford, England.

Van Loon, J. J., de Boer, J. G., & Dicke, M. (2000). Parasitoid-plant mutualism: parasitoid attack of herbivore increases plant reproduction. *Entomologia experimentalis et applicata*, 97(2), 219-227.

Van Timmeren, S., & Isaacs, R. (2013). Control of spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii*, by specific insecticides and by conventional and organic crop protection programs. *Crop Prot.* 54:126–33.

Verhoeven, K. J., Biere, A., Harvey, J. A., & Van Der Putten, W. H. (2009). Plant invaders and their novel natural enemies: who is naive? *Ecology Letters*, 12(2), 107-117.

Vet, L. E., & Dicke, M. (1992). Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annual review of entomology*, 37(1), 141-172.

Vet, L. E., & Groenewold, A. W. (1990). Semiochemicals and learning in parasitoids. *Journal of Chemical Ecology*, 16(11), 3119-3135.

Vet, L. E., Lenteren, J. V., Heymans, M., & Meelis, E. (1983). An airflow olfactometer for measuring olfactory responses of hymenopterous parasitoids and other small insects. *Physiological Entomology*, 8(1), 97-106.

Vieira, J. G., Krüger, A. P., Scheuneumann, T., Garcez, A. M., Morais, M. C., Garcia, F. R. M., Nava, D. E., & Bernardi, D. (2020a). Effect of temperature on the development time and life-time fecundity of *Trichopria anastrephae* parasitizing *Drosophila suzukii*. *Journal of Applied Entomology*, 144(10), 857-865.

Vieira, J. G. A., Krüger, A. P., Scheuneumann, T., Morais, M. C., Speriogin, H. J., Garcia, F. R. M., Nava, D. E., & Bernardi, D. (2020b). Some Aspects of the Biology of *Trichopria anastrephae* (Hymenoptera: Diapriidae), a Resident Parasitoid Attacking *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in Brazil. *Journal of Economic Entomology*, 113(1), 81-87.

Vilaró, F., & Soria, J. (2006). El cultivo de arándano en Uruguay. *Anuario 2006*.

Vinson, S. B. (1976). Host selection by insect parasitoids. *Annual review of entomology*, 21(1), 109-133.

Wajnberg, E., & Colazza, S. (2013). *Chemical ecology of insect parasitoids*. John Wiley & Sons.

Walsh D. B., Bolda, M. P., Goodhue, R. E., Dreves, A. J., Lee, J. C., Bruck, D. J., Walton, V. M., O'Neal, S. D., & 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*, 1: 1-7.

Wang, X. G., Stewart, T. J., Biondi, A., Chavez, B. A., Ingels, C., Caprile, J., Grant, J. A., Walton, V. M., & Daane, K. M. (2016). Population dynamics and ecology of *Drosophila suzukii* in central California. *J Pest Sci* 89:701–712.

War, A. R., Paulraj, M. G., Ahmad, T., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., & Sharma, H. C. (2012). Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant signaling & behavior*, 7(10), 1306-1320.

Weisser, W. W., & Siemann, E. (2008). The various effects of insects on ecosystem functioning. In *Insects and ecosystem function* (pp. 3-24). Springer, Berlin, Heidelberg.

White, E. M., Wilson, J. C., & Clarke, A. R. (2006). Biotic indirect effects: a neglected concept in invasion biology. *Diversity and Distributions*, 12, 443– 455.

Whittaker, R. H., & Feeny, P. P. (1971). Allelochemicals: chemical interactions between species. *Science*, 171(3973), 757-770.

Wilcove, D. S., Rothstein, D., Dubow, J., Phillips, A., & Losos, E. (1998). Quantifying threats to imperiled species in the United States. *BioScience*, 48(8), 607-615.

Williamson, M. (1996). *Biological invasions*. Chapman and Hall, London.

Witzgall, P., Kirsch, P., & Cork, A. (2010). Sex pheromones and their impact on pest management. *Journal of chemical ecology*, 36(1), 80-100.

Wollmann, J., Schlesener, D. C. H., Ferreira, M. S., Garcia, M. S., Costa, V. A., & Garcia, F. R. M. (2016). Parasitoids of Drosophilidae with potential for parasitism on *Drosophila suzukii* in Brazil. *Drosophila Information Service*, 99, 38-42.

Woltz, J. M., & Lee J. C. (2017). Pupation behavior and larval and pupal biocontrol of *Drosophila suzukii* in the field. *Biological control*, 110, 62-69.

Yamakawa, R., & Watanabe, K. (1991). Control and ecology of cherry drosophila. *Tohoku Agric Res* 44:221–222.

Yerushalmi, S., & Green, R. M. (2009). Evidence for the adaptive significance of circadian rhythms. *Ecology letters*, 12(9), 970-981.

Zhang, S., Wei, J., Guo, X., Liu, T. X., & Kang, L. (2010). Functional synchronization of biological rhythms in a tritrophic system. *PLoS One*, 5(6), e11064.