



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas
PEDECIBA-Biología, Sub-área Ecología y Evolución

Ecología Química para el manejo sostenible de *Drosophila suzukii*:
Respuesta olfativa de parasitoides y machos estériles
a claves químicas de fruta

Federico Triñanes

Directores: Dr. Andrés González Ritzel¹ & Dr. Gerardo J. de la Vega²

Tribunal: Dr. Diego F. Segura³, Dr. Fernando F. Locatelli⁴ & Dra. Paula Altesor⁵

Diciembre de 2024

¹Laboratorio de Ecología Química, Facultad de Química, Udelar, Montevideo, Uruguay.

²Grupo de Ecología de Poblaciones de Insectos, IFAB CONICET-INTA EEA, Bariloche, Argentina.

³Instituto de Genética "Ewald Alfredo Favret", INTA, GV-IABIMO, CONICET, Buenos Aires, Argentina.

⁴Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias, UBA, CONICET, Buenos Aires, Argentina.

⁵Unidad de Entomología, Dpto. de Protección Vegetal, Facultad de Agronomía, Udelar, Montevideo, Uruguay.

Contenido

Índice de figuras.....	4
Agradecimientos	5
Resumen	6
Estructuración de la tesis	8
Problema de investigación	9
Introducción	10
Ecología química en insectos: aportes a la sostenibilidad productiva	10
Olfacción periférica en insectos	11
<i>Drosophila suzukii</i> (Diptera: Drosophilidae)	12
Manejo Integrado de <i>Drosophila suzukii</i>	16
Capítulo I:	
Claves químicas asociadas a la búsqueda de hospederos del parasitoide de <i>Drosophila suzukii</i>, <i>Trichopria anastrephae</i> (Hymenoptera: Diapriidae)	
Control Biológico.....	17
<i>Trichopria anastrephae</i> (Hymenoptera: Diapriidae).....	18
Aprendizaje olfativo en parasitoides.....	20
Capítulo II:	
Caracterización de la capacidad olfativa en la técnica del insecto estéril de <i>Drosophila suzukii</i> (Diptera: Drosophilidae)	
Técnica del Insecto Estéril	22
Técnica del insecto estéril aplicada a <i>Drosophila suzukii</i>	23
Objetivos.....	25
Hipótesis.....	27
Materiales y Métodos.....	28
Plantas de frutilla (<i>Fragaria x ananassa</i>)	28
Infestación de la fruta.....	28
Colecta y análisis de volátiles	28
Insectos.....	30
Esterilización de <i>Drosophila suzukii</i>	30
Olfatometría: Respuesta comportamental a semioquímicos volátiles	31
Parasitoide, <i>Trichopria anastrephae</i> (Capítulo I)	31
Mosca, <i>Drosophila suzukii</i> (Capítulo II)	32
Electrofisiología (EAG/GC-EAD): Detección periférica de compuestos volátiles.....	32
GC-EAD y EAD dosis-respuesta de <i>Trichopria anastrephae</i> (Capítulo I)	33

EAG dosis-respuesta de <i>Drosophila suzukii</i> (Capítulo II)	34
Aprendizaje olfativo de <i>Trichopria anastrephae</i> (Capítulo I).....	35
Condicionamiento pre-imaginal.....	36
Aprendizaje asociativo	36
Micrografías electrónicas de barrido de antenas de <i>Drosophila suzukii</i> (capítulo II)	37
Análisis estadístico	38
Capítulo I:	
Claves químicas asociadas a la búsqueda de hospederos del parasitoide de <i>Drosophila suzukii</i>, <i>Trichopria anastrephae</i> (Hymenoptera: Diapriidae)	
Resultados	41
Compuestos Orgánicos Volátiles de frutilla (<i>Fragaria x ananassa</i>).....	41
Olfatometría de <i>Trichopria anastrephae</i> a VOCs de frutilla	44
Electrofisiología de <i>Trichopria anastrephae</i> a VOCs asociados a <i>Drosophila suzukii</i>	46
Condicionamiento pre-imaginal de <i>Trichopria anastrephae</i>	49
Aprendizaje asociativo de <i>Trichopria anastrephae</i>	50
Discusión.....	52
Capítulo II:	
Caracterización de la capacidad olfativa en la técnica del insecto estéril de <i>Drosophila suzukii</i> (Diptera: Drosophilidae)	
Resultados	57
EAG dosis-respuesta a ésteres frutales de moscas estériles	57
Orientación de moscas estériles en base a claves olfativas	60
Cuantificación de las sensillas olfativas en las antenas de las moscas estériles	62
Discusión.....	64
Perspectivas	67
Epílogo	68
Apéndice.....	69
I. GC-EAD de la avispa parasitoide, <i>Leptopilina boulardi</i>	69
II. Calidad del proceso de esterilización de <i>Drosophila suzukii</i>	72
Esterilidad-Fertilidad	72
Supervivencia	75
Referencias bibliográficas	77

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Drosophila suzukii</i>	13
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Trichopria anastrephae</i>	19
Figura 3. Plantas de frutilla (<i>Fragaria x ananassa</i>) utilizadas en los bio-ensayos.....	30
Figura 4. Establecimiento de los circuitos de electroantenografía (EAG/GC-EAD).....	33
Figura 5. Perfiles de VOCs de frutillas.....	41
Figura 6. Cuantificación de los ésteres mayoritarios de frutillas.....	43
Figura 7. Olfatometría de <i>Trichopria anastrephae</i> a frutillas en planta.....	45
Figura 8. Olfatometría de <i>Trichopria anastrephae</i> a VOCs de frutilla en solución.....	46
Figura 9. GC-EAD de <i>Trichopria anastrephae</i> a VOCs de frutilla.....	47
Figura 10. GC-EAD dosis-respuesta de <i>Trichopria anastrephae</i> a hexanoato de etilo.....	48
Figura 11. Aprendizaje pre-imaginal de <i>Trichopria anastrephae</i>	49
Figura 12. Aprendizaje asociativo de <i>Trichopria anastrephae</i>	50
Figura 13. EAG dosis-respuesta de moscas estériles a butanoato de etilo.....	58
Figura 14. EAG dosis-respuesta de moscas estériles a acetato de isoamilo.....	59
Figura 15. EAG dosis-respuesta de moscas estériles a hexanoato de etilo.....	60
Figura 16. Olfatometría de moscas estériles de <i>Drosophila suzukii</i>	61
Figura 17. Micrografías electrónicas de barrido de las antenas de <i>Drosophila suzukii</i>	62
Figura 18. Cuantificación de las sensilias olfativas de <i>Drosophila suzukii</i>	63
Figura 19. GC-EAD de <i>Leptopilina boulardi</i> a VOCs de frutillas.....	70
Figura 20. Cuantificación de las respuestas de GC-EAD de parasitoides a VOCs de frutillas.....	71
Figura 21. Esterilidad de <i>Drosophila suzukii</i> a 120 y 220 Gy (eclosión de huevos).....	73
Figura 22. Esterilidad de <i>Drosophila suzukii</i> a 120 Gy (número de pupas).....	74
Figura 23. Curvas de supervivencia de moscas estériles de <i>Drosophila suzukii</i>	75

Agradecimientos

A los responsables del Laboratorio de Ecología Química de la Facultad de Química, Carmen Rossini y Andrés González, a quienes les estoy profundamente agradecido por brindarme la oportunidad de continuar creciendo personal y académicamente en un extraordinario lugar, con grandes valores de personas, a los que les extiendo sentidamente el agradecimiento.

A los directores de la tesis, Andrés González y Gerardo de la Vega, les debo un especial y sentido agradecimiento por acompañarme tan cálidamente en esta etapa de enseñanzas, apoyándome e incentivándome constantemente a ir a más, por la confianza que depositaron en mí traducida en libertad de acción, y por estar a disposición siempre que los precisé.

A Diana Valle y Carolina Leoni de INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria), Las Brujas, quienes brindaron las instalaciones de la institución para el mantenimiento de las plantas y, especialmente a Diana, por su generosa colaboración en la logística de las mismas.

A Marcos Tassano del Centro de Investigaciones Nucleares de Facultad de Ciencias, amable colaborador para la obtención de insectos estériles, quien permitió ir más allá en las preguntas planteadas inicialmente en este capítulo, elevando la calidad y el alcance de la tesis. Extiendo el agradecimiento a Mirel Cabrera por su colaboración en la esterilización de muestras.

A Ana Laura Reyes del Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de Facultad de Ciencias, por su generosa colaboración en el procesamiento de las muestras, y permitir un abordaje aún más completo del capítulo sobre insectos estériles.

A los integrantes del tribunal, Paula Altesor, Diego Segura y Fernando Locatelli, les agradezco de antemano su amable disposición y dedicación para evaluar la tesis, cuyas devoluciones indudablemente serán muy valiosas para mí en esta instancia de formación.

A los más cercanos a mí, familiares y amigos, por la contención y cariñosa compañía en el extenso trajín para alcanzar esta etapa de la vida.

Por último, la tesis tuvo lugar gracias a la financiación de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) a través de una beca de Maestría, la Comisión Académica de Posgrado (CAP) por una beca de finalización de Maestría, y por parte de un proyecto CSIC (Comisión Sectorial de Investigación Científica) de Iniciación a la Investigación.

¡Muchas gracias!

Resumen

La ‘mosca de alas manchadas’, *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae), es una plaga de la fruta fina (frutillas, frambuesas y arándanos) de relevancia mundial. Está presente en Uruguay desde 2015 y representa una amenaza sanitaria para la fruticultura. Su incidencia próxima a la cosecha de la fruta restringe la aplicación de insecticidas, requiriendo la búsqueda de prácticas alternativas y ambientalmente sostenibles para su mitigación; entre ellas, el control biológico con parasitoides y la técnica del insecto estéril. Estas dos estrategias complementarias se abordan en esta tesis desde un enfoque de Ecología Química. Específicamente, se exploran las capacidades olfativas de un potencial bio-controlador, la avispa *Trichopria anastrephae* (Hymenoptera: Diapriidae), y de los machos de *D. suzukii* esterilizados por radiación ionizante. Los estímulos olfativos estudiados fueron compuestos volátiles de fruta, potenciales claves químicas de relevancia ecológica en un contexto agro-ecosistémico. Primeramente, evaluamos cómo incide la infestación de *D. suzukii* en los perfiles químicos de los compuestos volátiles de frutillas (*Fragaria x ananassa*) a los 5 y 10 días posteriores a la oviposición. Como resultado, obtuvimos que los perfiles presentan tres ésteres principales de cadena corta ubicuos de frutas; butanoato de etilo, hexanoato de metilo y hexanoato de etilo. La diferenciación entre los perfiles (fruta control vs. infestada) se observa al décimo día, y es parcialmente explicada por la dinámica de emisión de los ésteres mayoritarios. La frutilla infestada presenta una emisión incrementada de hexanoato de etilo y una emisión sostenida de hexanoato de metilo, el cual muestra una disminución en la frutilla libre de infestación. Mediante estudios de electrofisiología (GC-EAD), encontramos que los principales compuestos volátiles que conforman el perfil químico de la frutilla infestada son detectados por la antena del bio-controlador, pudiendo por lo tanto ser utilizados como claves químicas asociadas a la presencia del hospedero. Uno de estos ésteres frutales, el hexanoato de etilo, presenta una típica relación dosis-respuesta con saturación en ensayos de electroantenografía (EAG). Mediante bioensayos de olfatometría de doble opción, encontramos que los volátiles de frutilla infestada por *D. suzukii* resultan atractivos para hembras de *T. anastrephae*, en comparación con volátiles de frutilla sin infestación. Finalmente, en experimentos diseñados para estudiar el efecto de la experiencia olfativa previa en un potencial condicionamiento para la avispa, encontramos que la respuesta comportamental a hexanoato de etilo es modificada según la experiencia de oviposición en asociación a la clave olfativa, mas no la exposición al estímulo olfativo durante el desarrollo pre-imaginal.

En segundo término, evaluamos la afectación sensorial de la olfacción a nivel de la detección periférica (EAG dosis-respuesta) de machos de *D. suzukii* expuestos a distintas dosis de radiación esterilizante (0, 120 y 220 Gy), así como a nivel de número de sensilias olfativas en las antenas y del comportamiento en respuesta a claves olfativas (0 y 220 Gy). Las curvas dosis-respuesta a tres ésteres frutales (butanoato de etilo, acetato de isoamilo y hexanoato de etilo) asociados a probables sitios de encuentro entre sexos en ambientes naturales, mostraron una tendencia a la baja en la sensibilidad de la detección conforme aumenta la radiación administrada, y una disminución en la detección de los machos estériles con 220 Gy a dosis alta de estímulo. Sin embargo, no se observaron malformaciones ni reducciones en el número de sensilias olfativas, y serían igualmente competitivos en cuanto a la habilidad para orientarse en base a semioquímicos volátiles. Este abordaje sienta un precedente a nivel nacional en el uso de técnicas nucleares para la esterilización de insectos. Este hito, junto a la continuidad del estudio con parasitoides, contribuye al desarrollo de prácticas alternativas de mitigación de plagas de relevancia mundial presentes en Uruguay.

Palabras clave:

Drosophila suzukii, Control Biológico, Parasitoides, *Trichopria anastrephae*, Técnica del Insecto Estéril, Olfatometría, Electrofisiología (EAG/GC-EAD), Dosis-respuesta.

Estructuración de la tesis

La tesis comprende dos bloques temáticos correspondientes a dos estrategias alternativas, complementarias y sostenibles para la mitigación de *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). Los bloques comparten una introducción general, la cual versa sobre generalidades de la Ecología Química en insectos y el sentido de la olfacción, enfatizando su relevancia para las interacciones ecológicas. Seguidamente, se presenta a la especie plaga problema, destacando sus particularidades y la necesidad de desarrollar prácticas de manejo alternativas, dos de estas desglosadas en los siguientes capítulos. La introducción continúa con antecedentes específicos de cada bloque temático, referidos como Capítulo I y II. A continuación, se presentan objetivos e hipótesis, seguidos de una única sección de metodologías para ambos capítulos, aclarando en cada caso la correspondencia con cada capítulo.

El capítulo I, 'Claves químicas asociadas a la búsqueda de hospederos del parasitoide de *Drosophila suzukii*, *Trichopria anastrephae* (Hymenoptera: Diapriidae)', aborda la capacidad de *T. anastrephae* para encontrar al hospedero a través de semioquímicos volátiles resultantes del desarrollo de larvas de *D. suzukii* en una de las frutas susceptibles, las frutillas (*Fragaria x ananassa*). Este abordaje abarca la caracterización química de los compuestos volátiles de frutillas durante el transcurso de la infestación de *D. suzukii*, la respuesta comportamental de hembras de *T. anastrephae* a estas claves químicas, y la identificación de los compuestos activos a nivel periférico en las antenas de la avispa. Asimismo, se determinó la plasticidad comportamental condicionada por la experiencia olfativa, tanto durante el desarrollo pre-imaginal como en la etapa adulta, a través del aprendizaje asociativo.

En el capítulo II, 'Caracterización de la capacidad olfativa en la técnica del insecto estéril de *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae)', se aborda la calidad sensorial de la olfacción de los machos expuestos a distintas dosis de radiación, como posible indicador de la competitividad ante machos silvestres en relación al uso de claves olfativas. Este capítulo incluye abordajes de electrofisiología de la detección periférica a través de curvas dosis-respuesta a ésteres frutales, así como el análisis de micrográficas de barrido de las sensillas olfativas en las antenas y la evaluación de la capacidad de orientación en base a claves químicas atrayentes.

Los resultados y discusión de cada capítulo se desarrollan en forma separada, finalizando con un epílogo, perspectivas y anexos, y una sección única de referencias bibliográficas.

Problema de investigación

En los últimos 15 años, *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) se consolidó mundialmente como una amenaza para la producción de fruta de piel fina ante la ausencia de estrategias efectivas para su mitigación. Entre las múltiples estrategias consideradas a nivel internacional se destacan el control biológico por parte de parasitoides micro-himenópteros y la técnica del insecto estéril, dos estrategias complementarias e inocuas con el medio ambiente, y alternativas sostenibles a la dependencia de insecticidas de amplio espectro. En Uruguay, *D. suzukii* está mostrando una incidencia creciente desde su reporte inicial en 2015. Nuestra propuesta aborda ambas estrategias desde la perspectiva de la Ecología Química. Por un lado, apelando al proceso de olfacción de semioquímicos volátiles de fruta por parte de los bio-controladores, se evaluará la posibilidad de incrementar la eficiencia de búsqueda de hospederos mediante condicionamiento a compuestos volátiles frutales en distintos momentos de desarrollo del parasitoide. Por otro lado, se estudiarán posibles afectaciones subletales en la capacidad olfativa de machos estériles de *D. suzukii*, como una aproximación a una evaluación de competitividad en relación al uso de semioquímicos volátiles señalizadores de hábitats con presencia probable de hembras. Estas líneas de investigación contribuirán al desarrollo de prácticas de mitigación alternativas de una especie plaga de relevancia mundial, presente en Uruguay.

Introducción

Ecología química en insectos: aportes a la sostenibilidad productiva

Los animales captan información del ambiente a través de los sentidos. El procesamiento e integración de la información percibida por las distintas modalidades sensitivas permite adecuar aspectos comportamentales respecto a las necesidades del organismo y para con su entorno. El sentido de la olfacción, resultado de la sofisticación evolutiva de la respuesta de los organismos a las sustancias químicas del medio, captura información química, intangible y etérea del ambiente, entendida como 'olores'. Esta información es transducida fisiológicamente en aferencias eléctricas, potencialmente influyentes en la toma de decisiones de los organismos según la relevancia del sentido para cada taxón, cuyas consecuencias pueden trascender el nivel organizativo. En los insectos, por ejemplo, este sentido es de vital importancia y es ampliamente utilizado durante la búsqueda de sitios de alimentación, apareamiento y sustratos de oviposición, así como para evitar sitios de riesgo (Conchou et al., 2019; Hansson & Stensmyr, 2011).

La Ecología Química estudia las interacciones entre organismos, y de estos con el ambiente, mediadas por estímulos de naturaleza química. En esta disciplina converge la química de productos naturales, la eco-fisiología, la neurobiología y la etología, subyacentes a las interacciones químicas, para comprender aspectos evolutivos y las implicancias ecológicas de las especies involucradas. Los compuestos químicos involucrados en estas interacciones son denominados *semioquímicos* (Law & Regnier, 1971). Los semioquímicos se clasifican en *feromonas* cuando median interacciones entre organismos de una misma especie (intraespecífica), y *aleloquímicos* en el contexto de interacciones entre especies (interespecífica). Las feromonas fueron pioneras y representan un paradigma del éxito en la intercesión de la comunicación química en insectos. Estas poseen una gran capacidad de manipulación comportamental, actuando a baja cuantía y extrema especificidad. Los aleloquímicos, por su parte, son subclasificados en *kairomonas*, *alomonas* y *sinomonas* según el beneficiario de la interacción; receptor, emisor o ambos, respectivamente (Nordlund & Lewis, 1976). Dentro de estos, las plantas y los microorganismos contribuyen con una infinidad de compuestos utilizados por los insectos, sean parte de un proceso comunicativo donde existe una correspondencia en la transferencia de la información ('señales'), o simplemente la explotación de información no correspondida e informativa producto de la experiencia ('claves'). La interacción entre plantas e insectos conforman una relación dominante en la naturaleza, y acapara gran parte de la atención de la Ecología Química.

Dentro de la gran diversidad de los insectos, existen grupos de marcado interés para la humanidad, léase vectores de enfermedades, polinizadores, plagas agrícolas y enemigos naturales, entre otros. Por su parte, la conspicuidad de las plantas y su arreglo espacial es traducida como 'paisajes químicos' de los ambientes agro-productivos, ampliamente habitados y explotados por insectos herbívoros, así como los niveles tróficos superiores (depredadores y parasitoides) (Loreto et al., 2014). En gran medida, los semioquímicos biogénicos son de naturaleza volátil y actúan a distancia, y son comúnmente denominados Compuestos Orgánicos Volátiles (VOCs; *Volatile Organic Compounds*, por sus siglas en inglés). Los VOCs son compuestos carbonados de bajo peso molecular, lipofílicos, caracterizados por una elevada presión de vapor a temperatura ambiente y altos puntos de fusión (Mostafa et al., 2022). Estos contribuyen a los rasgos etéreos de las plantas, cuya composición permite una aproximación taxonómica (Vivaldo et al., 2017), además de fenológica (Satake et al., 2024) y de su adecuación como sustrato, tanto para insectos herbívoros como para sus enemigos naturales (Meiners, 2015). De un tiempo a esta parte, esta caracterización de los semioquímicos volátiles ha captado considerable atención dirigida al desarrollo de estrategias alternativas y ambientalmente sostenibles para la mitigación de plagas agrícolas (Peñaflor, 2019; Anton & Jacquín-Joly, 2022).

Olfacción periférica en insectos

En los insectos, la detección periférica de los semioquímicos se produce mayoritariamente a nivel de las antenas y, en menor medida, en los palpos maxilares. Este proceso implica la internalización de una 'señal' química del ambiente y su transducción en una señal eléctrica aferente al sistema nervioso central del organismo. Las sensilias olfativas son proyecciones cuticulares porosas o surcadas que revisten la superficie de las antenas, a través de las cuales ingresan los compuestos químicos. Estas se clasifican morfológicamente en basicónicas, tricoideas, coelocónicas, placodeas y caéticas, principalmente, y presentan una determinada distribución longitudinal en las antenas. En el interior de estas estructuras sensoriales, se disponen las dendritas de las neuronas bipolares olfativas (OSN/ORN; *Olfactory Sensory/Receptor Neuron*, por sus siglas en inglés), presentes en un número variable según el tipo de sensilia. En la membrana plasmática de estas dendritas se ubican los receptores olfativos (ORs; *Olfactory Receptors*, por sus siglas en inglés) donde se transduce la señal. Los ORs de los insectos son canales iónicos hetero-tetraméricos con una subunidad co-receptora 'ORco' compartida entre taxones e indispensable para su funcionalidad (Sato et al., 2008). El transporte entre la cutícula y la membrana, dos puntos de naturaleza hidrofóbica, es realizado por proteínas

extracelulares con sitios de unión a los VOCs (OBPs; *Odorant Binding Proteins*, por sus siglas en inglés) secretadas por células auxiliares a las OSNs.

Las especies expresan una determinada serie de ORs para la detección de compuestos frecuentemente asociados a su especialización ecológica (Bohbot & Pitts, 2015; De Bruyne & Baker, 2008). Cada sensilia puede alojar OSNs con expresión diferencial de ORs activados por distintos grupos de compuestos químicos. De esta manera, una neurona puede responder a múltiples compuestos (Siddiqi, 1987). La distribución no estocástica de las sensilias en las antenas define regiones con distinta sensibilidad a ciertas moléculas odorantes (Ayer & Carlson, 1992; Stocker, 2001). En múltiples especies del género *Drosophila*, por ejemplo, las OSNs de las sensilias basicónicas y coelocónicas, mas no las tricoideas, son estimuladas por distintos ésteres asociados a fuentes de alimento (De Bruyne et al., 2001).

La accesibilidad del sistema olfativo periférico de los insectos, la externalidad de las estructuras olfativas y la direccionalidad de las aferencias, permiten registrar fácilmente a nivel fisiológico la respuesta eléctrica consecuente a la estimulación olfativa a través de técnicas de registro de electroantenografía. De esta manera, es posible realizar un *screening* de compuestos potencialmente y ecológicamente relevantes. Dado que un compuesto fisiológicamente activo a nivel de las antenas no necesariamente tiene una implicancia comportamental directa, los experimentos de electrofisiología de la olfacción son acompañados con bioensayos de olfatometría para interpretar su significancia ecológica. En contraposición, el sentido inverso de la sentencia anterior ha de cumplirse, la detección periférica es indispensable para la atribución de un comportamiento en respuesta a claves olfativas.

Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae)

La ‘mosca de alas machadas’, *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae), es una especie asiática plaga de la fruta de piel fina (cerezas, frutillas, arándanos, frambuesas, entre otras). Además de su importancia en el sector frutícola, representa una amenaza creciente para el sector vitícola, y latente para el de frutos nativos en Uruguay. A diferencia de otras especies de *Drosophila*, la fruta en proceso de maduración con calidad de comercialización es el sustrato de oviposición preferido por las hembras de *D. suzukii* (Lee et al., 2011), estableciendo una segregación de nicho competitivamente benéfica por la colonización anticipada de un recurso compartido con sus congéneres. Esta ventaja competitiva es posibilitada por la presencia de un ovipositor aserrado y esclerotizado característico de las hembras de la especie, utilizado para la perforación de la epidermis de la fruta y la deposición interna de los huevos (Atallah et al., 2014)

(Fig. 1). El desarrollo de los estadios inmaduros se produce a expensas del consumo del contenido de la fruta, con la consecuente aceleración de su deterioro (Cini et al., 2012). La especie es sumamente prolífica a un amplio rango de condiciones ambientales (Tochen et al., 2014, 2016), y tiempos generacionales acotados (Lee et al., 2011).

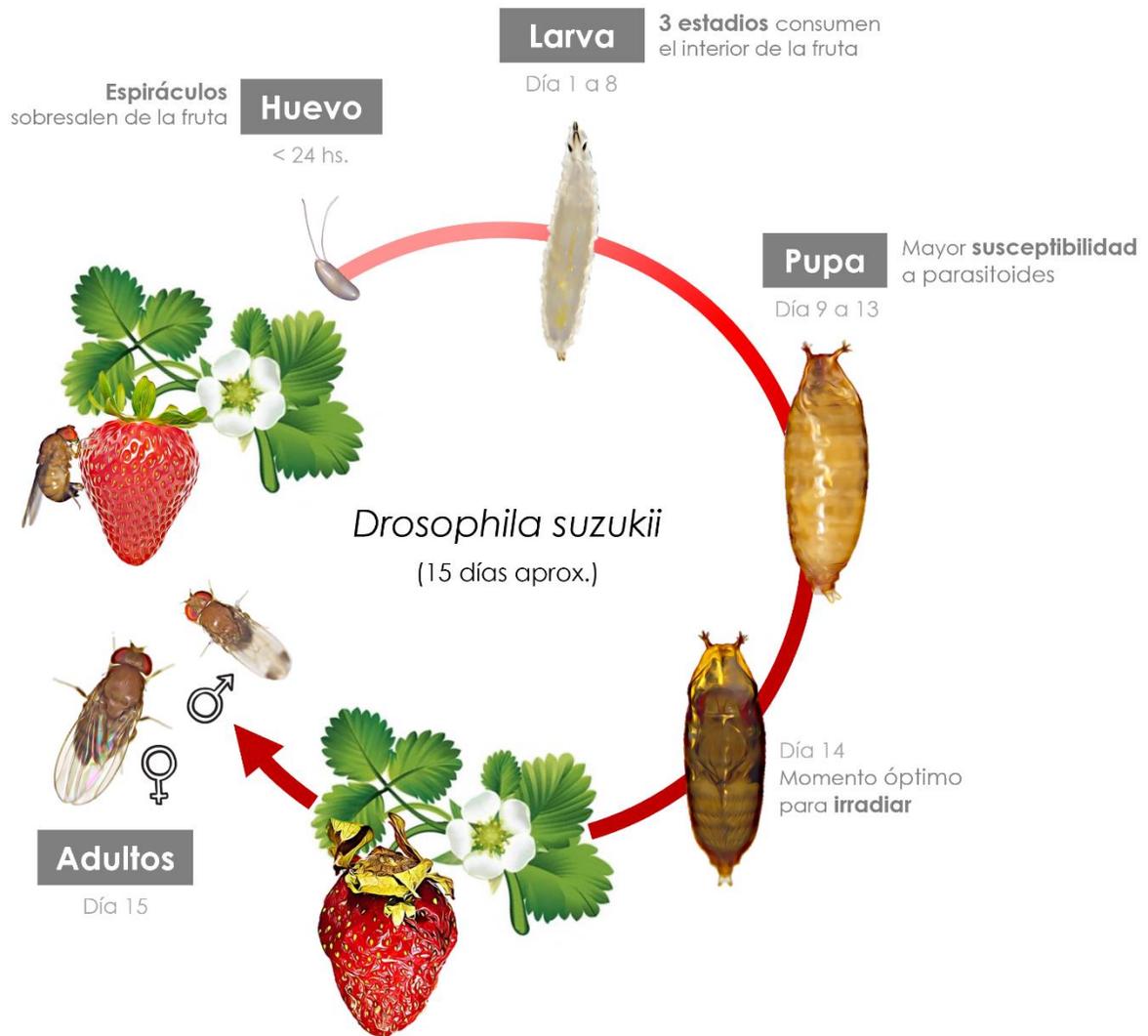


Figura 1. Representación del ciclo de vida de *Drosophila suzukii*.

A la actualidad, la especie se encuentra presente en Asia, Europa, África y América (Andreazza et al., 2017; Kwadha et al., 2021; Walsh et al., 2011). En Uruguay, fue detectada en 2015 en cultivos de arándanos en el departamento de Canelones (González et al., 2015). Dos años más tarde, fue reportada en el centro-sur del país; Montevideo, Maldonado, San José y Canelones,

inclusive en predios de frutos nativos como arazá rojo y arazá amarillo (Lauyé, 2017). El presente año (2024), la especie fue detectada en cultivos de frutilla y vid (Ings. Agrs. Valentina Mujica y Andrés Coniberti, comunicación personal), y en arazá (Dra. Victoria Calvo, comunicación personal). No obstante, la especie no está ingresada como especie exótica invasora en la base de datos del Observatorio Ambiental Nacional (OAN), así como tampoco en el compendio '*Especies exóticas invasoras de Uruguay: distribución, impactos socioambientales y estrategias de gestión*' (2021) realizado por el 'Comité de Especies Exóticas Invasoras', Ministerio de Ambiente y la Universidad de la República (Brazeiro et al., 2021).

El carácter polífago de *D. suzukii* no se limita a variedades de frutas cultivables, sino que múltiples 'hospederos alternativos' actúan como reservorios para la especie (Diepenbrock et al., 2016; Lee et al., 2015). La susceptibilidad de la vegetación adyacente le permite eludir las prácticas de manejo aplicadas sobre los predios cultivados, mayormente basadas en el uso de insecticidas de síntesis de amplio espectro (Van Timmeren & Isaacs, 2013), cuya residualidad representa una limitante adicional debido a la incidencia de *D. suzukii* próxima a la cosecha de la fruta, sumada a la remanencia en el ambiente asociada a su periodicidad de aplicación. Existen además reportes de resistencia desarrollada a insecticidas para esta especie (Gress & Zalom, 2019). El manejo convencional suele ser acompañado con trampas cebadas con compuestos de fermentación de baja selectividad (Cha et al., 2012).

Las características biológicas y ecológicas de *D. suzukii* desafían a los métodos convencionales de manejo de plagas, y urgen la búsqueda de prácticas alternativas más específicas y sostenibles para la mitigación de la especie. En esta búsqueda, las interacciones químicas de la especie recibieron especial atención y a la actualidad se ha reunido vasta información. Durante las primeras aproximaciones desde la Ecología Química, se estudió la existencia de una feromona en *D. suzukii*, debido a la disrupción comportamental específica intrínseca de estos compuestos. Sin embargo, rápidamente esta línea evanesció ante la ausencia aparente de una vía de comunicación basada en feromonas en esta especie. El compuesto acetato Z-11-octadecenilo (cVA; *cis-Vaccenyl Acetate*, por sus siglas en inglés) es una feromona sexual ubicua del clado *melanogaster* (al cual también pertenece *D. suzukii*) producida por los machos de las especies (Symonds & Wertheim, 2005). *Drosophila suzukii* posee una atrofia anatómica del sitio de producción de esta feromona, reducciones en la expresión de la respectiva OSN y de las dimensiones del glomérulo del lóbulo antenal, mas no en la funcionalidad del respectivo receptor periférico (Dekker et al., 2015). Recientemente, Lima y colaboradores (2023) han propuesto al compuesto Z-9-tricoseno como una 'feromona' para *D. suzukii* pese a su ubicuidad en el género

Drosophila, además de estar presente en otras especies de Diptera. *A priori*, estos resultados descartarían el desarrollo de estrategias especie-específica basadas en feromonas. Ante este escenario, la atención recayó en los aleloquímicos relevantes potencialmente para la ecología de la especie, y con especial énfasis para las hembras dada su responsabilidad en el origen del daño en los cultivos.

Como especie frugívora, el desarrollo de los estadios larvales sucede a expensas del consumo de la fruta y, una vez alcanzado el estadio alado de la adultez, buscarán parejas sexuales para viabilizar la descendencia potencial y, seguidamente, una nueva fruta donde depositar sus huevos para dar continuidad al ciclo de la especie. Estos procesos ocurren en paisajes químicos dominados, en términos de biomasa e importancia ecológica, por olores de fruta, principalmente ésteres. El grado de maduración de la fruta utilizada preferentemente como sustrato de oviposición es una dimensión de nicho diferenciable de *D. suzukii* dentro del clado *melanogaster*. Esta diferenciación ecológica conlleva implícitamente una serie de adaptaciones evolutivas confluyentes a múltiples niveles sensoriales, principalmente mecano-sensoriales, olfativos y gustativos (Karageorgi et al., 2017), además de la estructura anatómica para la oviposición (Atallah et al., 2014).

A nivel sensorial de la olfacción, otras especies del grupo *melanogaster* presentan un elevado grado de conservación de los ORs (Stensmyr et al., 2003). Keeseey y colaboradores (2015), a través de un abordaje análogo demuestran una mayor sensibilidad electrofisiológica por VOCs asociados a fruta en maduración por parte de *D. suzukii* en relación a *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). En algunos casos, *D. suzukii* presenta repetidas copias de los ORs de VOCs típicos de fruta en maduración, tal como los ésteres de cadena corta, en detrimento de aquellos asociados a productos de fermentación (Ramasamy et al., 2016; Revadi et al., 2015). Sin embargo, los estados de maduración avanzados de la fruta son igualmente preferidos por ambas especies de *Drosophila*, inclusive estados más fermentativos (Keeseey et al., 2015). Por lo tanto, los VOCs como claves sensoriales asociadas al sustrato de oviposición brindan una explicación parcial sobre la utilización preferencial de sustratos no sobre-maduros. Los mismos autores, reportaron la influencia comportamental del compuesto de hojas de plantas de frutilla, β -ciclocitral, sobre *D. suzukii* y no detectado por las otras *Drosophila* evaluadas, *D. melanogaster* y *Drosophila biarmipes* (Diptera: Drosophilidae). El β -ciclocitral es un producto de la oxidación del carotenoide β -caroteno, e importante compuesto con funciones señalizadoras, tanto intra-organismo como intra- e inter-específico (Havaux, 2020). En *D. suzukii*, está probada la atractividad a este compuesto, así como sus efectos sinérgicos con acetatos y ésteres frutales

con grados de atracción diferenciales entre los sexos (Piñero et al., 2019). Algunos de estos ésteres, como ser hexanoato de etilo y hexanoato de metilo, han sido reportados como componentes de feromonas de otras especies del género *Drosophila* (Symonds & Wertheim, 2005).

Manejo Integrado de *Drosophila suzukii*

El Manejo Integrado de Plagas (IPM; *Integrated Pest Management*, por sus siglas en inglés) (re)surge como paradigma para la seguridad alimentaria ante la dependencia exacerbada de insecticidas para la mitigación de plagas agrícolas (Kogan, 1998). Este abordaje no prescinde completamente de las prácticas químicas, sino que minimiza su utilización en *pro* de prácticas alternativas, culturales y biológicas, dirigidas a mantener los niveles poblaciones de la plaga debajo de un umbral de daño admisible. Las prácticas culturales están dirigidas principalmente al manejo del hábitat para desfavorecer las condiciones óptimas para el desarrollo de la especie. Entretanto, las prácticas biológicas fomentan las interacciones ecológicas benéficas del sistema (control biológico) y la manipulación del comportamiento de los organismos a través de semioquímicos (control comportamental). De manera implícita, el IPM implicó abandonar la noción de soluciones genéricas para la vasta cantidad de casos e ir hacia estudio de caso especie- y sistema de producción-específico. Así, es necesario un profundo conocimiento sobre aspectos biológicos y ecológicos de la especie, considerando el contexto de aplicabilidad de las distintas prácticas (Tait et al., 2021).

En el caso de *D. suzukii*, el uso de insecticidas está por demás restringido por el momento de la incidencia de la especie, y tanto más necesario es un manejo integrado para su mitigación. En este sentido, se ha desarrollado una extensa base de conocimiento sobre la biología de la especie, y por su estatus de plaga, con particular énfasis en estrategias de mitigación. La Ecología Química, por su parte, propone abordajes desde las habilidades olfativas tanto de *D. suzukii*, a través de la identificación de semioquímicos para la manipulación comportamental de la especie, como la utilización de claves químicas por parte de enemigos naturales, para el desarrollo u optimización de prácticas con una impronta sostenible.

Capítulo I:

Claves químicas asociadas a la búsqueda de hospederos del parasitoide de *Drosophila suzukii*, *Trichopria anastrephae* (Hymenoptera: Diapriidae)

Control Biológico

El Control Biológico (CB) consiste en la regulación de la población natural de una especie plaga por acción de otro organismo (Stenberg et al., 2021). Se basa en interacciones ecológicas preexistentes en la naturaleza y es un componente fundamental dentro de un IPM. Según Stenberg y colaboradores (2021), se considera CB cuando (1) es mediado por organismos vivos, (2) el objetivo, directa o indirectamente, es una especie plaga y (3) se apela a agentes residentes, con y sin intervención antrópica ('CB de conservación' y 'CB natural', respectivamente), o los agentes se introducen de forma permanente o temporal ('CB clásico' o 'CB aumentativo', respectivamente). El organismo con capacidad de regular a la especie objetivo es denominado 'agente de control biológico', 'bio-controlador' o 'enemigo natural'.

Entre los agentes de CB de *D. suzukii* se destacan microorganismos entomopatógenos (hongos y bacterias), virus, nemátodos, insectos depredadores y parasitoides (Lee et al., 2019; Wang et al., 2020). Dentro de estos últimos, se encuentran los agentes más promisorios, extensamente relevados en distintas regiones del mundo y estudiada su adecuación a la plaga.

Los parasitoides son insectos tróficamente dependientes de otro artrópodo, denominado hospedero, al cual terminan truncándole el desarrollo. Cuando el hospedero es una especie plaga, esta cualidad es ampliamente aprovechada para reducir la presión sobre los agro-ecosistemas, y explica la atención desde el ámbito científico para comprender esta interacción ecológica. Los parasitoides, además de interrumpir eficientemente el ciclo de su hospedero, primeramente, deben ser capaces de localizarlo en los agro-ecosistemas. Aunque son ambientes naturales simplificados en cuanto a la complejidad ecológica, dado su elevado grado de antropización, los agro-ecosistemas no dejan de ser escenarios desafiantes para la subsistencia de estos organismos. Los enemigos naturales de especies fitófagas habitan ambientes cuyos paisajes químicos están dominados por vegetación y explotan considerablemente esta información en la búsqueda de hospederos (Vet & Dicke, 1992).

Las especies hospederas frugívoras suelen ser poco conspicuas por su desarrollo completo, o gran parte de él, internamente en la fruta. No obstante, están estrechamente asociadas a los olores de fruta y/o tienen una incidencia sobre patrones de emisión de VOCs de esta, advirtiendo

indirectamente su presencia. La búsqueda de hospederos en tiempo y forma es un proceso determinante en el éxito reproductivo de los parasitoides (Vinson, 1976). Este proceso es optimizado a larga distancia por semioquímicos volátiles de plantas, especialmente a partir de aquellas dañadas por herbivoría (Price et al., 1980). La herbivoría suele modificar cualitativa y/o cuantitativamente la emisión de VOCs del sustrato, informando acerca de la condición del sustrato y contribuyendo al establecimiento de interacciones tri-tróficas en la naturaleza (Heil, 2008; Felton & Tumlinson, 2008). Dada la importancia del proceso de búsqueda de hospederos para la eficacia de estrategias de liberación masiva de parasitoides en ambientes naturales, entender cómo los parasitoides utilizan las claves químicas del ambiente puede tener implicancias en la implementación de esta clase de estrategias.

Drosophila suzukii es susceptible a múltiples especies de parasitoides, comprendidas principalmente en las familias Braconidae, Figitidae, Pteromalidae y Diapriidae (Carton et al., 1986). Entre las más destacadas y consideradas como agentes de control biológico se encuentran *Ganaspis brasiliensis* (Hymenoptera: Figitidae), una avispa parasitoide de larvas, *Trichopria drosophilae* y *Trichopria anastrephae* (Hymenoptera: Diapriidae), ambas especies generalistas de pupas de dípteros. Dentro de estas especies, se han encontrado distintas poblaciones de *T. anastrephae* establecidas naturalmente en Uruguay.

Trichopria anastrephae (Hymenoptera: Diapriidae)

La avispa microhimenóptera, *Trichopria anastrephae* (Hymenoptera: Diapriidae), es un endoparasitoide idiobionte, generalista de pupas de especies de Diptera (Drosophilidae y Tephritidae). Esto es, el desarrollo inmaduro sucede en el interior del hospedero y detiene el desarrollo de este último al momento de ser parasitado, respectivamente. La especie fue descrita por Costa Lima (1940) en asociación con especies del género *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) en Brasil. Los sucesivos reportes de la especie restringen su distribución a la región Neotropical (Boscán & Godoy, 1996; Cruz et al., 2011; Ovruski et al., 2000). Pese a la aparente ausencia de una historia co-evolutiva entre *T. anastrephae* y *D. suzukii*, la avispa se desarrolla eficientemente sobre este novel hospedero con tasas de parasitismo alentadoras para su implementación como bio-controlador, tanto en condiciones controladas de laboratorio (Funes et al., 2024; Vieira et al., 2019, 2020), semi-naturales en cultivos de invernadero (Krüger et al., 2023), así como en ambientes naturales cultivados (Wollmann et al., 2016), y sobre vegetación adyacente no cultivada (Buonocore-Biancheri et al., 2024) (Fig. 2).

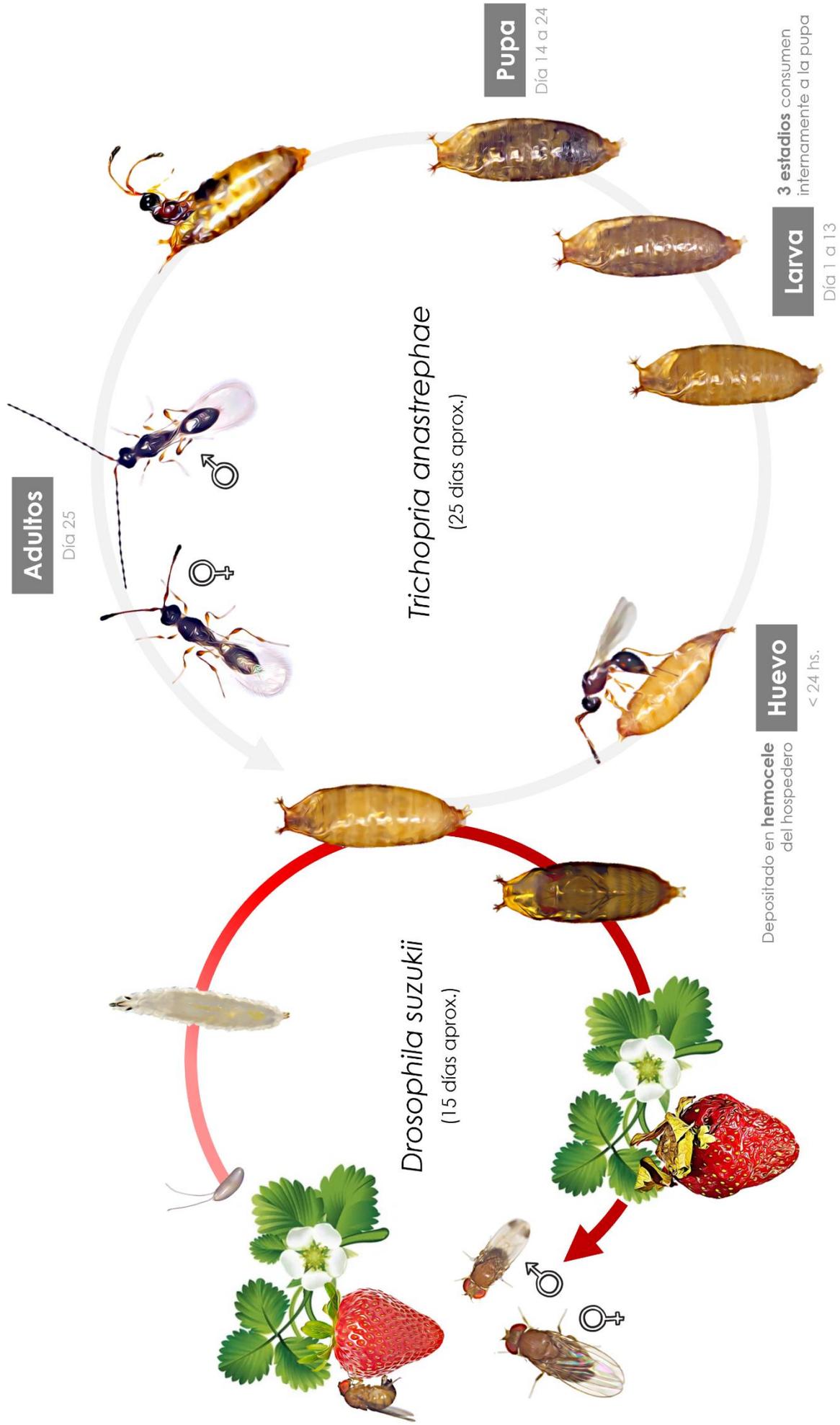


Figura 2. Representación del ciclo de vida de *Trichopria anastrephae* utilizando a *Drosophila suzukii* como hospedero.

Esta especie está íntimamente emparentada con otro bio-controlador de *D. suzukii*, *Trichopria drosophilae* (Hymenoptera: Diapriidae), producido a escala comercial para liberaciones masivas en Europa. En cuanto a sus capacidades olfativas, ambas especies parasitoides del género *Trichopria* detectan y son atraídas a olores de fruta infestadas por *D. suzukii* (de la Vega et al., 2021; Wolf et al., 2020). La presencia de poblaciones adaptadas a las condiciones ambientales regionales, más la habilidad innata para desarrollarse en *D. suzukii*, sugieren la consideración de *T. anastrephae* como agente bio-controlador en América. No obstante, estos parasitoides son especies generalistas, cuyos hospederos alternativos explotan nichos disímiles en relación al tipo de fruta y al grado de madurez de la misma. Una fruta puede ser identificada como tal a partir de la composición global de VOCs, donde la mixtura y proporciones de los compuestos pueden dar indicios para una clasificación más precisa (Mostafa et al., 2022), así como del grado de progresión de la maduración de la fruta (Keeseey et al., 2015). Entonces, el 'paisaje químico' frutal proporciona potenciales claves informativas sobre la presencia y, eventualmente, la identidad del hospedero. Los semioquímicos volátiles tienen un importante rol modulador en distintas interacciones biológicas, siendo partícipes fundamentales en la estructuración trófica entre las plantas, los insectos herbívoros y los respectivos enemigos naturales (Price et al., 1980). En este sentido, la manipulación de parasitoides a través de semioquímicos puede resultar en programas de control de plagas más efectivos (Colazza & Wajnberg, 2013), y el aprendizaje de olores asociados a su hospedero es una de ellas (Dukas, 2000; Giunti et al., 2015).

Aprendizaje olfativo en parasitoides

La capacidad de aprendizaje es un aspecto ampliamente reportado en parasitoides himenópteros (Giunti et al., 2015; Lewis & Tumlinson, 1988). La plasticidad asociada al proceso de aprendizaje le permite a estos organismos adaptarse a condiciones ambientales cambiantes (Dukas, 2000). La visión (colores y formas, entre otros patrones) y la olfacción, son los principales sentidos involucrados asociados a procesos de aprendizaje en parasitoides (Giunti et al., 2015). En relación a este último, el comportamiento exhibido por parasitoides es lábil a la experiencia olfativa en distintas etapas del desarrollo, tanto en estados inmaduros del desarrollo holometábolo (pre-imaginales) como de adultos, siendo más propensos estos últimos, y con una mayor predisposición inmediatamente después de la emergencia (Turlings et al., 1993). Este fenómeno es una oportunidad para manipular el comportamiento de los bio-controladores, permitiendo eventualmente incrementar la eficacia de búsqueda de hospederos y, por tanto, la efectividad del control biológico (Papaj & Vet, 1990).

El aprendizaje durante etapas tempranas del desarrollo es denominado 'condicionamiento pre-imaginal' (Thorpe & Jones, 1937) y está relacionado al (cuestionado) 'Principio de Selección de Hospedero' propuesto por Walsh (1864). Este último atribuye la ocurrencia de un proceso de especialización del insecto adulto en base a su experiencia alimenticia durante estadios inmaduros del desarrollo. Por otro lado, existen reportes sobre la influencia de los VOCs del sustrato infestado por el hospedero a los que están expuestos los parasitoides durante su desarrollo (Gandolfi et al., 2003; Gutiérrez-Ibáñez et al., 2007). En ambos casos, implícitamente sucederían procesos cognitivos perdurables a los drásticos cambios asociados a los eventos de metamorfosis y determinantes en la toma de decisiones del adulto.

Por su parte, el aprendizaje asociativo (apetitivo/aversivo) entre una respuesta comportamental innata (por ejemplo, alimentación u oviposición) y un estímulo condicionado, cualquiera sea su naturaleza (por ejemplo, química), ha sido evaluado y demostrado en múltiples especies de avispas parasitoides, particularmente relacionado al proceso de búsqueda de hospederos (Giunti et al., 2015). En consecuencia, se observan modificaciones comportamentales en próximas exposiciones al (ahora) estímulo condicionado (Lewis & Tumlinson, 1988; Lewis & Takasu, 1990; Little et al., 2019). En asociaciones relacionadas al hospedero, la oportunidad de oviposición se considera que actúa como refuerzo del aprendizaje a la clave olfativa (Kerguelen & Cardé, 1996). El aprendizaje olfativo ha sido extensamente abordado en parasitoides de estadios larvales de drosófilidos, tanto en especies generalistas como especialistas, del género *Leptopilina*. En este sistema, entre otros aspectos, se conocen las dinámicas de aprendizaje, la memoria, la plasticidad del aprendizaje adquirido (De Jong & Kaiser, 1991; Kaiser et al., 2003; Papaj & Vet, 1990).

A su vez, la memoria de la asociación es un rasgo variable entre especies, y puede tener relación con el número de eventos de refuerzo de la asociación (Giunti et al., 2015; Hoedjes et al., 2011). Asimismo, existe variabilidad en la capacidad de aprendizaje según el compuesto químico o la mixtura de compuestos evaluada (Meiners, 2003). Sin embargo, existen también casos de asociación de compuestos ecológicamente irrelevantes como fragancias artificiales (De Jong & Kaiser, 1991) u orgánicas; vainilla (Kerguelen & Cardé, 1996) o metilsulfonilmetano (Frederickx et al., 2014). Otro factor influyente sobre la capacidad de aprendizaje de una especie es su grado de especialización trófica, bajo el supuesto de que las especies generalistas habitan ambientes heterogéneos y donde este atributo podría adquirir una mayor relevancia ecológica (Little et al., 2019). No obstante, la capacidad de aprendizaje es un rasgo sujeto inclusive a variaciones poblacionales (Hoedjes et al., 2011).

Por el contrario, y exceptuando al supuesto sobre la especialización trófica y las capacidades de aprendizaje, existen casos donde no se observan modificaciones comportamentales tras la aplicación de procedimientos de aprendizaje. Por ejemplo, tal es el caso del parasitoide generalista, *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae), cuyas preferencias olfativas de la avispa adulta es independiente de las experiencias olfativas (Potting et al., 1997).

El capítulo I del presente trabajo, aborda las habilidades olfativas del parasitoide nativo, *T. anastrephae*, en relación con la búsqueda de *D. suzukii* a través de VOCs frutales, tanto desde aspectos comportamentales y electrofisiológicos de la olfacción, como la plasticidad del comportamiento en respuesta a claves olfativas a través de distintos procesos de aprendizaje.

Capítulo II:

Caracterización de la capacidad olfativa en la técnica del insecto estéril de *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae)

Técnica del Insecto Estéril

La Técnica del Insecto Estéril (SIT; *Sterile Insect Technique*, por sus siglas en inglés), considerada como 'CB autocida', es una estrategia de mitigación e incluso erradicación de especies plaga y vectores de larga data. A la actualidad, múltiples especies han sido controladas a través de la SIT en distintas partes del mundo (diferentes especies de la familia Tephritidae plagas de frutales, 'moscas Tsé-Tsé' vectores de la 'enfermedad del sueño' y el 'gusano barrenador del ganado', *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), causante de miasis.

La técnica se basa en la esterilización de insectos tras exposiciones a radiación ionizante (gamma o X) en alguna etapa de su desarrollo. La sensibilidad a la radiación y la tasa de división celular están asociadas positivamente (Bakri et al., 2005). En este sentido, el momento más apropiado del desarrollo para la esterilización es el estado de pupación tardía, cuando las células somáticas se encuentran en tasas basales de división a diferencia de las células germinales, además de la practicidad de manipulación asociada a su quiescencia. Las células germinales son más sensibles a la radiación en términos de mutagénesis, produciendo aberraciones cromosómicas, mal-formando los tejidos reproductivos, y dando lugar a adultos estériles (Robinson, 2005). Estas células presentan distinto grado sensibilidad a la radiación entre las distintas especies de insectos, y definen la dosis necesaria para su esterilización (Bakri et al., 2005). Además de cada especie, cada sexo posee una dosis de esterilización completa específica (Dyck et al., 2005). La esterilidad deriva del daño cromosómico de las células

germinales, ocasionando la inhibición de la mitosis de huevos fecundados debido al desbalance genético de los gametos. La inviabilidad de la progenie producto de la cópula entre hembras silvestres fértiles y machos estériles, disminuye el potencial reproductivo de la especie (Knipling, 1955). Tras liberaciones masivas y periódicas de machos estériles, se logra disminuir el potencial reproductivo de las poblaciones naturales y los niveles poblacionales tienden a descender en el tiempo, inclusive logrando escenarios de erradicación de la especie. No obstante, las células somáticas no están exentas de posibles afectaciones secundarias capaces de comprometer el desempeño de los adultos estériles debido a una capacidad competitiva disminuida. De esta manera, la efectividad de la técnica depende ampliamente de cuán competitivos sean los machos estériles en relación a los silvestres por acceso a cópulas en la naturaleza (Calkins & Parker, 2005).

El género *Drosophila* es un modelo clásico en biología con un vasto cúmulo de estudios desde múltiples disciplinas, entre ellas la radiobiología. Sin embargo, abordajes desde la ecología química de los insectos estériles es un área escasamente explorada. Nuestra propuesta evalúa posibles afectaciones sensoriales de la olfacción en machos estériles de *D. suzukii* relevantes durante el proceso de búsqueda de parejas sexuales, y capaces de comprometer la eficacia de la SIT en esta especie.

Técnica del insecto estéril aplicada a *Drosophila suzukii*

La SIT es una de las prácticas de más reciente consideración para la mitigación de *D. suzukii*. La dosis de radiación para lograr la esterilización completa en la especie está establecida, 50-75 Gy para las hembras (Lanouette et al., 2017), en tanto para los machos asciende a 200 Gy (Krüger et al., 2018). Por otra parte, han sido evaluados parámetros de competitividad como la capacidad de vuelo y la supervivencia bajo condiciones nutricionales de estrés, y ninguno resultó ser afectado por la radiación (Krüger et al., 2018). Del mismo modo, el porcentaje de emergencia y la proporción de sexos serían insensibles a la radiación (Krüger et al., 2018). En relación al comportamiento reproductivo, la propensión de las hembras de copular en múltiples ocasiones sería baja y la cópula con machos estériles no modificaría este patrón (Krüger et al., 2019). Sin embargo, se ha observado reducciones en la duración de la cópula de los machos estériles, y las hembras irradiadas muestran una mayor latencia para iniciar la cópula (Krüger et al., 2019). En 2022, se realizó el primer ensayo en condiciones naturales de liberación masiva de machos estériles de *D. suzukii*, donde Homem y colaboradores (2022) aducen una reducción de la población natural de hembras superiores al 90 %. El mismo año, la asociación FAO-IAEA (*Food*

& Agriculture Organization-International Atomic Energy Agency, por sus siglas en inglés) publicó un compendio basado en las publicaciones sobre radiobiología de *D. sukuzii* para su cría masiva y el procedimiento para su esterilización (FAO-IAEA, 2022).

La principal dificultad de la SIT para *D. sukuzii* radica en la imposibilidad de sexar antes de la irradiación, dada la ausencia de caracteres sexualmente dimórficos evidentes en ese momento del desarrollo. Esto ha impulsado otra serie de investigaciones sobre técnicas moleculares (*gene drive*-CRISPR/CAS9) (Yadav et al., 2023) y la automatización del sexado en base al dimorfismo sexual de los adultos (Dr. Gerardo de la Vega, comunicación personal) para la obtención, irradiación y liberación únicamente de machos estériles. De momento, esta dificultad implicaría la liberación tanto de machos como de hembras y, si bien la dosis para esterilizar completamente a los machos excede y asegura la esterilidad de las hembras, la capacidad de daño de las hembras estériles con la oviposición de huevos infecundos continúa siendo una incógnita. De todas formas, el impacto de la técnica a nivel de las poblaciones naturales debería permanecer inalterada, y con esta los escenarios plausibles de erradicación de la especie.

A la actualidad, las afectaciones posibles a la sensibilidad del sistema olfativo de *D. sukuzii* subyacentes a la radiación esterilizante es un aspecto inexplorado, pese a su potencial relevancia en relación a la competitividad de los machos estériles en contextos naturales, y siendo un aspecto fundamental de la SIT. En el capítulo II del presente trabajo, nuestro interés se centra en el estudio de la competitividad de los machos estériles de *D. sukuzii* en relación al uso de claves químicas volátiles orientadoras de posibles sitios de cópula de la especie en los agroecosistemas, a nivel fisiológico, morfológico y comportamental.

Objetivos

Objetivo general

La tesis aborda dos estrategias alternativas y complementarias basadas en controladores biológicos para el manejo sostenible de *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). Primeramente, se evaluó la capacidad de detección periférica y la respuesta comportamental de *Trichopria anastrephae* (Hymenoptera: Diapriidae) a semioquímicos volátiles resultantes del desarrollo de larvas de *D. suzukii* en plantas de frutilla (*Fragaria x ananassa*). Dentro de la evaluación de esta estrategia, se estudió también la plasticidad de la respuesta del parasitoide según la experiencia olfativa previa, en distintas etapas de su desarrollo. En segundo término, enmarcado en la técnica del insecto estéril, evaluamos la capacidad olfativa a nivel electrofisiológico, morfológico y comportamental de los machos estériles de *D. suzukii*, como posible factor de competitividad frente a machos silvestres.

Objetivos específicos

Capítulo I: Claves químicas asociadas a la búsqueda de hospederos del parasitoide de *Drosophila suzukii*, *Trichopria anastrephae* (Hymenoptera: Diapriidae)

- 1) Caracterizar el perfil de volátiles de frutillas infestadas por *Drosophila suzukii* a los 5 y 10 días posteriores a la infestación, en comparación con frutillas no infestadas.
- 2) Identificar los compuestos químicos electrofisiológicamente activos a nivel periférico en las antenas de hembras de *Trichopria anastrephae*, y caracterizar la relación dosis-respuesta de la señal olfativa.
- 3) Evaluar la respuesta comportamental de hembras de *Trichopria anastrephae* a frutillas infestadas por *Drosophila suzukii*.
- 4) Determinar la plasticidad comportamental de hembras de *Trichopria anastrephae* en base a la experiencia olfativa durante etapas pre-imaginales del desarrollo y la capacidad de aprendizaje asociativo durante la adultez.

Capítulo II: Caracterización de la capacidad olfativa en la técnica del insecto estéril de *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae)

- 1) Determinar la capacidad olfativa de machos estériles de *Drosophila suzukii* (120 y 220 Gy) a nivel electrofisiológico de las antenas mediante curvas dosis-respuesta a ésteres frutales.
- 2) Evaluar la habilidad de orientación de machos estériles de *Drosophila suzukii* (220 Gy) mediada por semioquímicos volátiles.
- 3) Cuantificar las sensilias olfativas a nivel de las antenas de machos estériles de *Drosophila suzukii* (220 Gy).

Hipótesis

Capítulo I: Claves químicas asociadas a la búsqueda de hospederos del parasitoide de *Drosophila suzukii*, *Trichopria anastrephae* (Hymenoptera: Diapriidae)

- El desarrollo de *Drosophila suzukii* modifica la emisión de compuestos volátiles de la fruta, las hembras de *Trichopria anastrephae* detectan dicho cambio a nivel de las antenas y pueden utilizar estas claves durante la búsqueda de hospederos. La experiencia olfativa en distintas etapas del desarrollo del parasitoide condiciona las preferencias olfativas durante la adultez.

Capítulo II: Caracterización de la capacidad olfativa en la técnica del insecto estéril de *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae)

- El proceso de esterilización de *Drosophila suzukii* a través de radiación ocasiona afectaciones en las capacidades olfativas (a nivel fisiológico, morfo-anatómico y/o comportamental) de los machos adultos.

Materiales y Métodos

Plantas de frutilla (*Fragaria x ananassa*)

Para la realización de esta tesis, se utilizaron plantas de frutilla, *Fragaria x ananassa* Duchesne (Rosales: Rosacea), de la variedad Yrupé. Dicha variedad es un producto registrado por el programa de mejoramiento genético de hortalizas del INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Uruguay, 2019), caracterizada por su desempeño sanitario ante plagas y enfermedades (Vicente et al., 2019). Las plantas se mantuvieron individualmente en macetas (1,5 litros) con sustrato para frutos rojos (Kekkilä®), en condiciones de invernadero en INIA, Las Brujas (Canelones, Uruguay) hasta la fructificación (Fig. 3A). Cuando las frutillas completaban su coloración rojiza característica, las plantas fueron acondicionadas en una incubadora a temperatura, humedad y fotoperíodo controlados (25 °C durante la fase diurna y 15 °C en la fase nocturna, 60% de humedad relativa constante, y fotoperíodo 16:8 horas de luz y oscuridad, respectivamente) en el Laboratorio de Ecología Química (Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay). Al día siguiente se inició la sesión de colecta de volátiles.

Infestación de la fruta

Cada frutilla, mantenida en planta, fue expuesta a tres parejas de *D. suzukii* durante 24 horas (Fig. 3B). Para esto, las frutillas fueron envueltas con una jaula de tul (20 x 10 cm), conteniendo un marco rectangular de acetato plegado en su interior para prevenir el colapso de la jaula y permitir la libre circulación de las moscas sobre la superficie de la frutilla. La jaula se sujetó desde el pedúnculo floral envuelto con algodón, mediante un precinto plástico. En el extremo opuesto, un eppendorf con su base removida sujetado con un precinto plástico fue la vía de ingreso de las moscas. En el lado interior del tubo se colocó algodón humedecido. Para cuantificar el grado de infestación de las frutillas, se removieron de la planta una vez culminada la colecta de volátiles, y se sumergieron en una solución saturada de sacarosa (> 20% m/v) para exponer a flote los distintos estadios inmaduros de la mosca y así realizar su conteo.

Colecta y análisis de volátiles

Se realizó la colecta de volátiles de frutillas individuales de plantas infestadas en forma controlada por *D. suzukii*, y de frutillas de plantas libres de infestación (Fig. 3C). Se colectaron los volátiles durante 24 horas en tres momentos del proceso de infestación. En primer lugar, se hizo una colecta inicial para conocer el perfil de volátiles de partida antes de ser asignada a un tratamiento.

Luego, se continuó con una colecta intermedia al día 5 y una colecta final al día 10, posteriores a la infestación de la frutilla. Las frutillas fueron envueltas en una bolsa de poliéster (20 x 15 cm) con una lámina de acetato rectangular enrollada en su interior, evitando el colapso de la bolsa debido a la succión del aire y permitiendo la circulación del aire circundante a la frutilla. La bolsa de colecta fue sujeta al pedúnculo floral junto con un filtro de carbón activado para permitir el ingreso de aire filtrado mediante un precinto plástico. El filtro consistió en un tubo de teflón (5 cm de largo y 6 mm de diámetro) con carbón activado granulado en su interior contenido entre lana de vidrio. Por el extremo opuesto, se introdujo una pipeta Pasteur de vidrio con 60 mg de material adsorbente (HayeSep Q) contenido entre lana de vidrio en su interior, a través del cual circuló una corriente de aire para arrastrar los compuestos volátiles. La pipeta fue sujeta a la bolsa de colecta a través de un precinto plástico, y su extremo exterior fue conectado a una bomba de succión (Casella®, Apex2) utilizada con un flujo de 0.3 L/min.

Los VOCs retenidos en el adsorbente fueron eluidos con 1 mL de hexano (Carlo Erba®, destilado) adicionados lentamente a través de la pipeta, a razón de 5 gotas por minuto. Al extracto de volátiles así obtenido se le adicionó un estándar interno (100 µL de solución 60 µg/mL de tridecano) para la cuantificación de los compuestos presentes en la muestra. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta ser analizadas por cromatografía gaseosa y espectrometría de masas (GC-MS, *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, por sus siglas en inglés). Antes de la inyección en el GC-MS, las muestras se concentraron a 100 µL bajo corriente de N₂.

Las muestras fueron analizadas mediante GC-MS, Shimadzu QP5050 (Shimadzu Corp., Japón), equipado con columnas DB-5 y Carbowax (30 m, 0,25 mm de diámetro interno y 0.25 µm espesor de fase estacionaria). Las muestras (1 µL) fueron inyectadas en modo *splitless* (toda la muestra ingresa a la columna cromatográfica) con He como gas portador. El programa de temperaturas inició a 40 °C durante 1 minuto, incrementando hasta 150 °C a razón de 5 °C/minuto y subsecuentemente a 250 °C a 10 °C/minuto, manteniendo la columna a 250 °C durante 1 minuto. La identificación de los compuestos se basó los patrones de fragmentación de la base de datos NIST 17, observados en el software *GCMS Solution* (Versión 4.45 SP1), así como en los índices de retención.

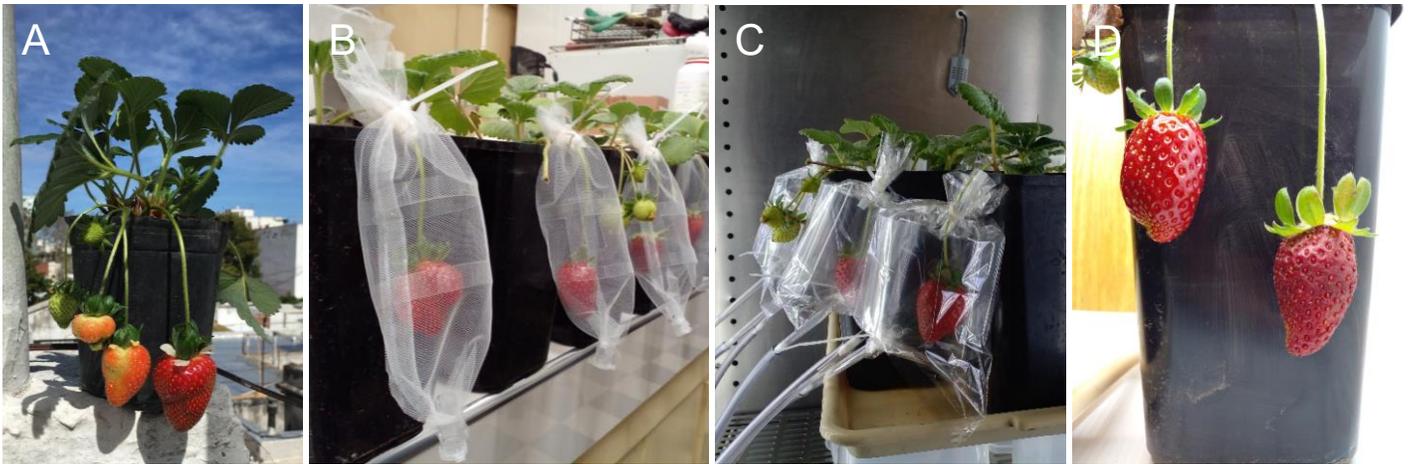


Figura 3. (A) Planta de frutilla (*Fragaria x ananassa*) en período de fructificación. (B) Jaulas para la infestación controlada de frutillas por *Drosophila suzukii*. (C) Colecta de volátiles de frutillas individuales. (D) Frutilla sana (izquierda) y fruta con 10 días de desarrollo de *Drosophila suzukii* (derecha).

Insectos

Los bioensayos fueron realizados en el Laboratorio de Ecología Química con insectos procedentes de capturas a campo realizadas en 2019, en Montevideo, Uruguay. Las moscas, *D. melanogaster* y *D. suzukii*, son mantenidas en tubos de cría estándar con dieta artificial a base de maíz (0,8 % agar, 4 % levadura de panificación, 8 % harina de maíz, 10 % glucosa (m/v), 0,3 % ácido propiónico y 0,9 % (v/v) de solución 10 % (m/v) de nipagín). Los recipientes de la dieta fueron escalados conforme era necesaria una mayor cantidad de pupas de *D. suzukii*. Por otra parte, las líneas de *T. anastrephae* son replicadas en *D. melanogaster* por su mejor *performance* en la dieta utilizada, además de evitar posibles condicionamientos en los bioensayos comportamentales. Los parasitoides son alimentados periódicamente con agua-miel (50 % v/v). Los insectos permanecen en ambientes controlados de temperatura, humedad y fotoperíodo (22 ± 1 °C, 65 ± 5 % de humedad relativa y 12 horas de luz y oscuridad).

Esterilización de *Drosophila suzukii*

Las moscas fueron esterilizadas en el Centro de Investigaciones Nucleares (CIN, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay) con un irradiador GammaCell 4000A de fuente de Cobalto (^{60}Co). Fueron expuestas a distintas dosis de radiación gamma (120 y 220 Gy) durante etapas de pupación tardía (< 24 horas previas a la emergencia de los adultos), previamente lavadas con agua destilada y secadas, contenidas en bolsas de poliéster. Las dosis se obtuvieron con tiempos de exposición aproximados de 3 h. 45 min. y 7 h. 30 min., respectivamente, a una tasa aproximada de 0,49 Gy/min. Cada tanda de irradiación tenía su

respectivo grupo control de la irradiación (0 Gy), los cuales permanecían sobre el irradiador durante toda la sesión. A su término, las pupas fueron individualizadas e incubadas a las condiciones habituales de cría hasta la emergencia de los adultos para su sexado bajo lupa en base a la genitalia externa o la coloración de las alas. En cada ocasión, se registró el porcentaje de emergencia y la proporción de sexos, además de las evaluaciones pertinentes sobre la esterilidad-fertilidad lograda y la sobrevivencia, a modo de validación de la técnica (ver '[Apéndice II](#)').

Olfatometría: Respuesta comportamental a semioquímicos volátiles

Parasitoide, *Trichopria anastrephae* (Capítulo I)

Se evaluó la respuesta comportamental de *T. anastrephae* a través de ensayos de olfatometría de doble opción (tubo en Y; 6 cm de cada sección) a olores de fruta asociados a su hospedero en distintas presentaciones; (1) canalizando los olores directamente desde la frutilla, envuelta de forma análoga al método de colecta de volátiles, dirigiendo la salida de aire hacia los brazos de la arena experimental (23 réplicas), (2) los VOCs de frutilla en solución dispensados en septos de goma (10 μ L) obtenidos de los extractos de colectas de volátiles (61 réplicas), y (3) a dos dosis de hexanoato de etilo sintético (100 y 1000 ng) en oportunidad de evaluar los distintos procesos de aprendizaje (descritos a continuación). En ocasión de evaluar VOCs en solución, los septos cargados reposaban una hora antes de su utilización para permitir la absorción de los compuestos y la evaporación del solvente. Los septos fueron depositados en recipientes cilíndricos horizontalmente dispuestos y conectados a los brazos de la arena experimental, a través de los cuales fluyen longitudinalmente las corrientes de aire. Los estímulos en solución fueron evaluados en comparación a un mismo volumen de solvente. Las avispas evaluadas tenían entre 5 y 10 días de edad, grávidas y alimentadas con agua-miel (50 % v/v). El aire circulante del sistema fue previamente filtrado por carbón activado, humidificado y su flujo regulado (0,25 L/min). El comportamiento individual fue registrado durante 3 minutos, y la preferencia se analizó en base a la primera elección, el tiempo de permanencia en cada sección del dispositivo y la posición final de la avispa. Las réplicas donde la avispa no exhibía preferencia (inmóviles) fueron descartadas para el análisis estadístico y son reportadas en el porcentaje de movilidad.

Mosca, *Drosophila suzukii* (Capítulo II)

Se evaluó la orientación de machos de *D. suzukii* en base a estímulos químicos volátiles a través de ensayos de captura de doble opción, de acuerdo a la metodología utilizada por Tatarko et al. (2023), con ligeras modificaciones. Las trampas 'pit-fall elevadas' consistían en viales de vidrio (1,5 cm de diámetro y 4,5 cm de altura) con un *tip* de pipeta automática de 1000 μ L modificado introducido, actuando de embudo e impidiendo la salida de las moscas una vez capturadas. El conteo de las capturas en los viales se registró visualmente. El atrayente utilizado fue el producto comercial *Suzukii Trap*® (50 μ L), dispensado en septos de goma para evitar la estimulación visual dada su coloración (anaranjada) característica. El control de la estimulación fue un mismo volumen agua destilada. Las trampas fueron dispuestas en esquinas opuestas de la arena experimental, distanciadas a 10 cm. La arena experimental consistía de un recipiente plástico (13 cm de lado y 20 cm de altura) cerrado con una tapa perforada en su centro (7 cm de diámetro) y cubierta por tela de tul a modo de ventilación. Las moscas fueron liberadas desde la parte central de la arena, desde donde también se proporcionaba agua destilada *ad libitum* a través de un algodón embebido. En cada unidad de experimentación se evaluaron 10 machos adultos de 3 a 7 días de edad expuestos a distinta dosis de radiación (0 y 220 Gy). Se registró la proporción de capturas transcurridas 2, 4, 8 y 24 horas. Se completaron 12 y 15 réplicas para las moscas control (0 Gy) y moscas estériles (220 Gy), respectivamente.

Electrofisiología (EAG/GC-EAD): Detección periférica de compuestos volátiles

Las señales eléctricas aferentes al sistema nervioso central, resultantes de la detección periférica de compuestos volátiles, pueden ser registradas por electroantenografía (EAG; *Electroantennography*, por sus siglas en inglés), estableciendo un circuito eléctrico paralelo al neurofisiológico de los insectos. La técnica presenta variantes según la vía de ofrecimiento de los compuestos químicos; detección electroantenográfica acoplada a cromatografía gaseosa (GC-EAD; *gas chromatography-electroantennographic detection*, por sus siglas en inglés), cuando los compuestos son separados previamente a través de una columna cromatográfica, identificando qué compuesto/s de una mezcla produce/n respuesta/s electrofisiológica/s, o EAG en su versión clásica, al dispensar las soluciones desde un soporte (por ejemplo, papel de filtro) y el/los compuesto/s es/son arrastrado/s por corrientes de aire de flujo, momento y duración controladas. Esta última, permite relacionar la dosis ofrecida y la amplitud de la señal eléctrica obtenida, aproximando así los límites inferior y superior de la detección.

En ambos insectos estudiados, tanto la avispa parasitoide como la mosca, el circuito eléctrico fue establecido a través de micro-electrodos de plata (Ag/AgCl), dispuestos dentro de capilares de vidrio e inmersos en las respectivas soluciones salinas conductoras (Ephrussi & Beadle, 1936); Solución Ringer Beadle-Ephrussi (NaCl 128 mM, KCl 4,7 mM y $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,9 mM), para *T. anastrephae*, y solución Ringer *Drosophila* (NaCl 46 mM, KCl 182 mM, CaCl_2 3 mM y Tris base 10 mM, pH = 7), en el caso de las moscas. El electrodo de registro establecía contacto con el extremo apical de las antenas, en tanto el electrodo de referencia contactaba la parte basal de la antena en el caso de *T. anastrephae* (Fig. 4A), o en la sección posterior de la cabeza en *D. suzukii* (Fig. 4B). Las señales eléctricas fueron pre-amplificadas mediante una *combi-probe* Syntech (Países Bajos) y re-amplificadas por un amplificador de alta impedancia (IDAC-2, Syntech; Países Bajos), visualizadas y analizadas en el *software* de Syntech (versión 2014).

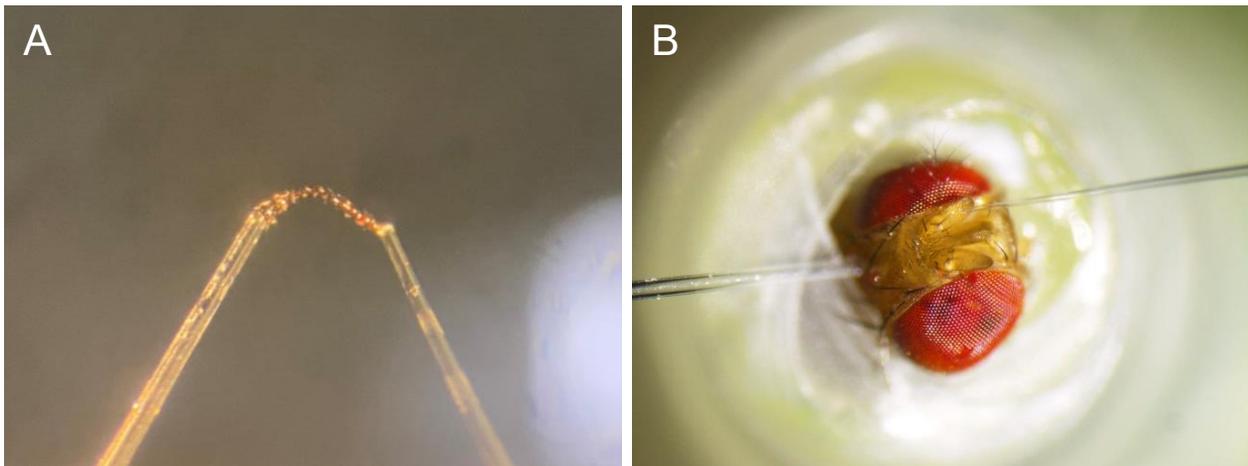


Figura 4. Establecimiento de los circuitos de electroantenografía. (A) Antena de *Trichopria anastrephae* suspendida entre los capilares de los electrodos de registro (izquierda) y de referencia (derecha). (B) Mosca encephala de *Drosophila suzukii* contactada con el capilar del electrodo de registro sobre a la región IV del funículo (derecha) y el capilar con el electrodo de referencia contacta la parte posterior de la cabeza (izquierda).

GC-EAD y EAD dosis-respuesta de *Trichopria anastrephae* (Capítulo I)

Se utilizaron antenas aisladas de hembras adultas de *T. anastrephae* menores a 10 días de edad. A la antena extirpada, se le removió el escapo y el último flagelómero del flagelo, y fue montada a la salida de la columna de un cromatógrafo de gases. El sistema cromatográfico consistió en un GC (Hewlett-Packard, 5890 series II) equipado con una columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm ; Alltech, USA) y un detector de ionización de llama (FID, *Flame Ionization Detector*, por

sus siglas en inglés). La temperatura del inyector y el detector se mantuvo a 250 °C, y la interfase de EAD (Syntech TC-02) a 220 °C. Las muestras (1 µL) se inyectaron en modo *splitless* utilizando H₂ como gas portador (2 mL/min). El efluente de la columna es dividido en partes iguales entre el FID y el EAD, utilizando N₂ (20 mL/min) como gas adicional de compensación antes de la división. Por otra parte, un controlador de *delivery* de estímulos Syntech (CS-55, Países Bajos) dirigía los compuestos eluidos de la columna hacia la antena a través de un flujo continuo de aire (1 L/min).

Detección de compuestos volátiles de frutilla

Los estímulos evaluados resultan de una mezcla de muestras representativas de volátiles de frutillas a los días 5 y 10 posteriores la infestación por *D. suzukii*. El programa de temperaturas fue semejante al utilizado para la identificación y cuantificación de compuestos por GC-MS. Se realizaron 20 réplicas independientes para cada uno de los tiempos post-infestación de la fruta, utilizando igualmente antenas izquierda y derecha ante una posible asimetría en la distribución de los ORs entre las antenas. Además, para este punto se evaluó la respuesta de otra especie de parasitoide, *Leptopilina boulardi* (Hymenoptera: Figitidae), de una forma análoga a las muestras mencionadas y la misma cantidad de réplicas (ver [‘Apéndice I’](#)).

Dosis-respuesta a hexanoato de etilo

La relación dosis-respuesta fue evaluada a través de una variante *ad hoc* a la clásica modalidad de ofrecimiento de estímulos. Las distintas dosis fueron ofrecidas vía GC isotérmico (100 °C), inyectadas en el cromatógrafo cada 105 segundos para una misma dosis (tres inyecciones de cada dosis) y 120 segundos entre las distintas dosis. De esta forma, se evitaba la co-elución del hexanoato de etilo con el solvente de la corrida siguiente, y brindaba un tiempo prudente para la recuperación eléctrica de la antena. Esta metodología permite una evaluación de dosis-respuesta en una misma antena, con dosis precisas y sin respuesta mecánica al aire, ambas limitaciones del EAG clásico. La preparación de las muestras contemplaba la división en partes iguales entre el FID y el EAD, ofreciéndole una serie de masa efectiva ascendente a la antena (0,10; 0,25; 0,40; 0,55; 0,70; 0,85; 1,00 ng). Se evaluó la relación dosis-respuesta en 8 réplicas independientes.

*EAG dosis-respuesta de *Drosophila suzukii* (Capítulo II)*

La relación dosis-respuesta de EAG fue evaluada en machos adultos vírgenes de *D. suzukii* de 3 a 14 días de edad, expuestos a distintas dosis de radiación; 0, 120 y 220 Gy. Las moscas

fueron encepadas en un *tip* de pipeta automática (200 μ L), cuyo extremo era más estrecho respecto al tórax, impidiendo su retorno con algodón desde el extremo posterior e inmovilizando la cabeza con cinta *parafilm*. A cada individuo se le ofreció cuatro pulsos de aire sucesivos (cada 45 segundos), arrastrando el compuesto aplicado en papel de filtro (1 cm^2 ; 10 μ L de una solución en hexano). Se ofreció una serie de concentración ascendente del compuesto de interés, obteniendo dosis en el papel de filtro 0,01; 0,1; 1; 10; 100; 1000 ng. Las estimulaciones de la antena se espaciaron 60 segundos para permitir la recuperación eléctrica de la antena. Los estímulos evaluados fueron tres ésteres típicos de fruta, butanoato de etilo, acetato de isoamilo y hexanoato de etilo. Antes del compuesto de interés, se le ofrecían cuatro pulsos del solvente (10 μ L de hexano), a modo de conocer la respuesta mecánica a los pulsos de aire y/o al solvente, y desconsiderar dicha amplitud en las posteriores respuestas. De cada cuarteta de pulsos, el primero era descartado del análisis por tender a dar respuestas mayores respecto a los tres pulsos restantes. Esta mayor respuesta se debe a que el compuesto se volatiliza durante un tiempo más prolongado antes del primer pulso, concentrándose dentro del cartucho sellado y liberando así una dosis mayor en el primer pulso. Los últimos tres pulsos corresponden a una dosis efectiva homogénea, por lo que se promedian entre sí las respuestas de la antena. A los promedios de cada dosis se le resta la respuesta promedio al solvente/aire.

Se completaron 14, 9 y 12 réplicas a butanoato de etilo, 11, 7 y 13 réplicas a acetato de isoamilo y 5, 3 y 11 a hexanoato de etilo para los distintos grupos de moscas (0, 120 y 220 Gy, respectivamente). Se contrastaron las curvas dosis-respuesta para cada compuesto entre los distintos tratamientos de radiación.

Aprendizaje olfativo de *Trichopria anastrephae* (Capítulo I)

Se evaluaron dos procesos de aprendizaje olfativo de *T. anastrephae* a través de la exposición a hexanoato de etilo sintético a distintos momentos del desarrollo del parasitoide. En ambos casos, el condicionamiento comportamental de hembras menores a 2 días de edad fue evaluado a través de ensayos de olfatometría de doble opción. En un brazo del olfatómetro se colocó el septo de goma cargado con hexanoato de etilo en solución de hexano (50 μ L) utilizado durante el condicionamiento; 100 ng de estímulo para evaluar las avispas pre-expuestas durante el desarrollo pre-imaginal, y 1000 ng de estímulo para evaluar el protocolo de aprendizaje asociativo. Entretanto, en el brazo control del olfatómetro se colocó un septo control cargado con un mismo volumen de solvente.

Condicionamiento pre-imaginal

El procedimiento consistió en la exposición de avispas a hexanoato de etilo en fase vapor, desde etapas tempranas del desarrollo hasta su emergencia (25 días, aproximadamente). Para minimizar la exposición a otros olores durante las etapas pre-imaginales, las pupas de *D. suzukii* fueron lavadas con agua destilada y aireadas brevemente sobre papel absorbente con anterioridad a ser parasitadas durante 24 horas, a razón aproximada de 1:15 (parasitoide y hospedero, respectivamente) según lo propuesto por Vieira et al. (2019). Los hospederos parasitados permanecieron incubados en la parte superior de un recipiente de acrílico con dos cámaras interconectadas, permitiendo la difusión y exposición al compuesto volátil, dispensado desde la cámara baja. El compuesto fue dispensado desde cebos (ácido esteárico y caolín, 70:30) cargados con 50 mg de hexanoato de etilo, recambiados cada 5 días (2,2 mg/día). De forma preliminar, fue evaluada la vida útil del cebo por pérdida de peso y la dinámica de emisión a través de colectas de volátiles y análisis cuantitativos de GC-MS (Dra. María Eugenia Amorós, comunicación personal), para establecer la frecuencia de reposición del cebo.

Aprendizaje asociativo

En este caso, evaluamos la capacidad de aprendizaje asociativo clásico a claves olfativas durante la etapa adulta de *T. anastrephae*. En este procedimiento, se ofrecieron hospederos (estímulo incondicionado) a hembras adultas de *T. anastrephae* de temprana edad (1 a 2 días), grávidas y alimentadas, para desencadenar la respuesta innata de oviposición mientras eran expuestas al compuesto volatilizado, hexanoato de etilo (*a priori*, estímulo neutro o aversivo a las dosis evaluadas en ensayos preliminares). El procedimiento de exposición fue semejante al realizado por Vet & Groenewold (1990) con leves modificaciones. Cada tratamiento fue llevado a cabo en matraces de 125 cm³ donde permanecían las avispas (10-15) en presencia de septos de goma embebidos con hexanoato de etilo, precargados con 1 hora de antelación. Se agregaron pupas del hospedador para permitir la oviposición durante 2 horas. Culminada la exposición asociativa, y transcurridos 30 minutos de descanso, se evaluó la preferencia comportamental en bioensayos de olfatometría de doble opción.

Para comprobar el suceso de aprendizaje de tipo asociativo, es decir, la capacidad de asociar la clave olfativa con una recompensa, en este caso, la presencia de hospederos, este procedimiento debió ser acompañado de los siguientes controles: (1) avispas sin hospederos expuestas al aire control (septo cargado con hexano), sin exposición a la clave olfativa, (2) avispas con experiencia de oviposición sin estimulación olfativa, (3) avispas expuestas

únicamente a la clave olfativa, y (4) avispas expuestas al olor y con experiencia en oviposición desfasados en el tiempo. La experiencia de oviposición fue sobre *D. suzukii* con menos de 24 horas de pupación, respetando la relación parasitoide-hospedero propuesta por Vieira y colaboradores (2019) mencionada anteriormente. De esta manera, el acceso a hospederos (considerados de buena calidad) asociado a una clave olfativa podría condicionar las preferencias olfativas en próximas exposiciones a la clave química.

Micrografías electrónicas de barrido de antenas de *Drosophila suzukii* (capítulo II)

La superficie de las antenas de machos de *D. suzukii* de 3 días de edad, estériles (220 Gy) y de los respectivos controles (0 Gy), fueron escaneadas para evaluar posibles afectaciones en el número de sensilias (basicónicas y tricoideas), así como observar posibles malformaciones asociadas al proceso de irradiación. Las sensilias basicónicas son las principales portadoras de OSNs con expresión de los ORs para los ésteres frutales evaluados a través de EAG.

Las muestras fueron procesadas y observadas en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Ciencias (Universidad de la República, Montevideo, Uruguay). Primeramente, las moscas ($n = 3$ para cada dosis de radiación) fueron fijadas durante 12 horas en glutaraldehído 2,5 %, doblemente lavadas con buffer fosfato (PBS, *Phosphate Buffered Saline*, por sus siglas en inglés) por 10 minutos cada una y, posteriormente, deshidratadas en una serie ascendente de alcohol (50°, 70°, 90° y 100°) durante 10 minutos cada una. Las muestras fueron mantenidas en alcohol absoluto (> 99,5%) y conservadas en frío (4 °C) hasta su secado y metalizado el día anterior a su observación. Previamente al secado, las moscas fueron decapitadas bajo alcohol absoluto. A continuación, el solvente fue eliminado a través de un secador de punto crítico de CO₂ (Denton Vacuum) para evitar el daño estructural de la superficie de las muestras, y estas fueron metalizadas con oro (plasma) mediante la técnica de *sputtering* (Denton Vacuum Desk II). La observación se realizó a través de un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM 5900-LV) a magnificaciones de x90 (cabeza), x350 (ambas antenas), x2000 y x4000 para observar en detalle regiones específicas de las antenas y cuantificar las sensilias olfativas, y entre x20000-45000 para la observación en detalle de los poros de las sensilias olfativas. El análisis de las micrografías se realizó a través del *software* ImageJ.

Análisis estadístico

El perfil de volátiles global fue analizado a través de un escalamiento multidimensional no-métrico (NMDS; *Non-Metric Multidimensional Scaling*, por sus siglas en inglés) y el contraste estadístico entre tratamientos mediante un ANOVA multivariante permutacional (PerMANOVA) en base a 9999 permutaciones (*'vegan' package*). Este test se utiliza dada su flexibilidad al no asumir una distribución de los datos previa y su falta de sensibilidad a la multi-colinealidad (Anderson, 2001). Los datos fueron transformados a la cuarta raíz ($X_{ij}^{1/4}$) dada la presencia de ceros en la matriz por la ausencia de ciertos compuestos (Wold et al., 2001). La matriz disimilitud utilizada fue la de 'Canberra'. Este índice suele ser utilizado en datos próximos a un origen por su sensibilidad a valores cercanos a cero. La transformación hace más simétricos los datos y evita que los compuestos mayoritarios definan el cálculo de la disimilitud. Entretanto, las diferencias cuantitativas de los compuestos mayoritarios entre los tratamientos fueron analizadas mediante regresiones lineales mixtas, simples y múltiples (*'nlme' package*).

Las variables categóricas (primera elección y posición final) de los ensayos de olfatometría de doble opción fueron analizadas mediante test binomiales, con probabilidad de éxito de $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{3}$, respectivamente (*'stats' package*). El tiempo de residencia fue analizado mediante el test de Wilcoxon no paramétrico ante el incumplimiento de los supuestos de la estadística paramétrica (*'stats' package*).

El análisis de las curvas dosis-respuesta se centró en los puntos de máxima separación entre los tratamientos (0, 120, y 220 Gy) la cual se producía a la mayor dosis de compuesto evaluada (1000 ng), excepto para hexanoato de etilo, cuyo contraste entre tratamientos fue realizado a la dosis de 100 ng. Estas diferencias fueron analizadas mediante regresiones lineales simples (*'stats' package*), y a través de los paquetes *'DHARMA'* y *'emmeans'* se evaluaron los ajustes de los modelos y la comparación múltiple entre tratamientos con corrección de Bonferroni, respectivamente.

Se utilizó estadística bayesiana para un modelo binomial (*'brms' package*) en la estimación de diferencias entre las proporciones de moscas capturadas según la dosis de radiación administrada (0 Gy vs. 220 Gy). El modelo bayesiano aplicado permite, con cierta flexibilidad, incorporar sencillamente variables aleatorias (caja de muestreo, fecha y tiempo de observación). Se utilizaron las previas por *default* (no informativas) y la cantidad de cadenas e iteraciones por cadena también por *default* (4 y 2000, respectivamente). Las características del modelo y el diagnóstico de residuos se constataron a través del paquete *'DHARMA'* y la comparación de

modelos (con y sin interacción con la variable temporal) se realizó con la función '*loo_compare*' para el criterio LOO ('*Leave-One-Out cross-validation*').

La densidad de sensilias olfativas (sensilias/mm²) en las antenas de moscas expuestas a distinta dosis de radiación (0 y 220 Gy) fue contrastada a través de un test de Student para las sensilias basicónicas y el test de Wilcoxon para las sensilias tricoideas.

Todos los análisis y gráficos se realizaron en el *software* R (versión 4.3.1).

Capítulo I:

Claves químicas asociadas a la búsqueda de hospederos del
parasitoide de *Drosophila suzukii*, *Trichopria anastrephae*
(Hymenoptera: Diapriidae)

Resultados

Compuestos Orgánicos Volátiles de frutilla (*Fragaria x ananassa*)

El análisis cualitativo y cuantitativo a través de GC-MS permitió identificar y cuantificar los VOCs característicos de las frutillas para determinar cómo incide la infestación de la plaga a nivel de la química volátil de la fruta. El grado de infestación de las frutillas fue variable, en promedio se constató la presencia de $10,2 \pm 6,4$ larvas en cada frutilla. Los perfiles de volátiles globales de frutillas a 5 y 10 días posteriores a la infestación de *D. suzukii*, y los respectivos controles de la infestación, fueron analizados a través de un escalamiento multidimensional no-métrico (NMDS). Cada punto representa una planta en el plano bidimensional como resultado de la disimilitud multivariada en relación a las plantas restantes, y los (mínimos) polígonos convexos trazan el agrupamiento de las plantas según su tratamiento (Fig. 5).

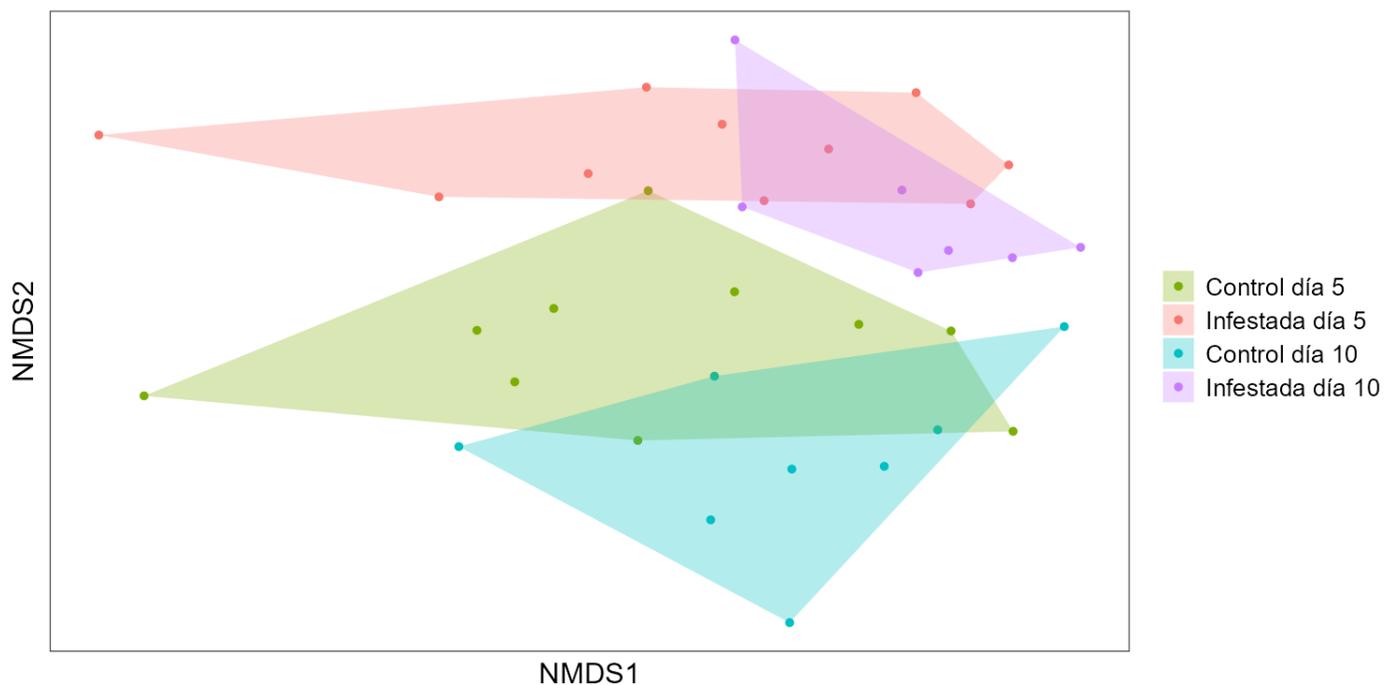


Figura 5. Ordenación multidimensional no-métrica (NMDS) basada en el índice de disimilitud de Canberra de los compuestos orgánicos volátiles de frutillas infestadas por *Drosophila suzukii*. Las frutillas infestadas por *D. suzukii* a los días 5 (rojo) y 10 post-infestación (violeta), y los correspondientes controles (verde y celeste, respectivamente). El valor de Stress fue 0,2. Los contrastes estadísticos fueron analizados a través de un MANOVA permutacional.

Estos planos nos permiten representar en dos dimensiones del espacio el perfil global de VOCs asociados a cada uno de los tratamientos y qué tan disímiles son en cuanto a su composición.

En la figura 5, se observa cómo los perfiles de volátiles de los tratamientos se van distanciando conforme progresa la maduración de la fruta y el desarrollo de los estadios inmaduros de *D. suzukii* en el interior de la fruta. Esta configuración en el espacio también se sustenta con las diferencias estadísticas entre tratamientos, validada estadísticamente a través de un MANOVA permutacional (PerMANOVA, p-valor = 0,0001).

Los contrastes entre los tratamientos indican la existencia de diferencias significativas entre la condición de la fruta (control vs. infestada) a ambos tiempos evaluados, 5 y 10 días posteriores a la infestación (test de PerMANOVA pareado, p-valor = 0,0426 y p-valor = 0,0036, respectivamente). Asimismo, la comparación entre los perfiles de VOCs de la fruta bajo distinta condición a través de los distintos tiempos de evaluación presenta diferencias estadísticamente significativas. Es decir, la emisión de VOCs de las frutillas libres de infestación a los 5 días respecto a los emitidos por frutillas infestadas a los 10 días post-infestación, y viceversa, los de las frutillas infestadas a los 5 días en relación a los de las frutillas libres de infestación al décimo día, también difieren entre sí (test de PerMANOVA pareado, p-valor = 0,0312 y p-valor = 0,0006, respectivamente). Por otro lado, el valor de Stress (0,2) según la escala de interpretación del Stress de Kruskal es un valor aceptable y la ordenación carece de arbitrariedad.

Los perfiles se evaluaron en base a los 30 compuestos volátiles identificados, desproporcionadamente representados por ésteres de cadena corta saturados y, en menor representación, ésteres insaturados, monoterpenos, sesquiterpenos, compuestos aromáticos y alcoholes, entre otros compuestos minoritarios. La emisión neta de compuestos por frutilla de un mismo tratamiento fue variable mas no tanto las proporciones de los compuestos (Tabla 1).

Tabla 1. Compuestos Orgánicos Volátiles (VOCs) agrupados por grupos químicos para cada tratamiento de las frutillas, infestadas por *Drosophila suzukii* y los respectivos controles, transcurridos 5 y 10 días posteriores a la infestación. La cantidad es expresada en μg equivalentes de estándar interno (tridecano) emitidos por frutilla durante 24 horas (promedio \pm desviación estándar).

Grupos químicos	Día 5		Día 10	
	Control	Infestada	Control	Infestada
<i>Ésteres saturados</i>	40,3 \pm 24,2	51,5 \pm 55,3	31,8 \pm 20,3	68,4 \pm 41,3
<i>Ésteres insaturados</i>	0,4 \pm 0,2	0,5 \pm 0,5	0,5 \pm 0,6	2,4 \pm 1,7
<i>Monoterpenos</i>	0,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,09 \pm 0,02
<i>Sesquiterpenos</i>	0,4 \pm 0,3	0,5 \pm 0,3	0,3 \pm 0,2	0,5 \pm 0,3
<i>Aromáticos</i>	0,05 \pm 0,03	0,10 \pm 0,06	0,02 \pm 0,02	0,1 \pm 0,1
<i>Alcoholes</i>	0,2 \pm 0,3	0,5 \pm 0,7	0,3 \pm 0,6	0,4 \pm 0,4

En los cuatro perfiles analizados se identifica la presencia de tres compuestos dominantes; butanoato de etilo, hexanoato de metilo y hexanoato de etilo, tres ésteres saturados frutales típicos cuyas emisiones varían en los distintos tratamientos. El análisis multivariado (regresión lineal múltiple) entre las cantidades netas emitidas de los ésteres mayoritarios, contemplando el efecto aleatorio de la identidad de las plantas, muestra significancia estadística para la interacción entre el tiempo y los tratamientos ($F = 8,0097$, $p\text{-valor} = 0,0115$). De los contrastes estadísticos entre cada tiempo y tratamiento, la mayor diferencia estadísticamente significativa resulta al décimo día entre las plantas control y las plantas infestadas ($T\text{-ratio} = -3,069$, $p\text{-valor} = 0,0319$). Entretanto, se observan diferencias estadísticas marginalmente significativas entre las plantas control al día 5 y las plantas infestadas al día 10 ($T\text{-ratio} = -2,559$, $p\text{-valor} = 0,0859$) y entre los distintos tiempos para las plantas infestadas ($T\text{-ratio} = -2,805$, $p\text{-valor} = 0,0538$). Posteriormente, analizamos las diferencias cuantitativas de los tres ésteres evaluados individualmente. A los 5 días posteriores a la infestación por *D. suzukii* no se observan diferencias cuantitativas para ningún compuesto entre tratamientos. Sin embargo, con el transcurso del tiempo se comienzan a observar las diferencias; entre los tratamientos para hexanoato de metilo y hexanoato de etilo al décimo día, y entre los tiempos para hexanoato de metilo en las frutillas control y para hexanoato de etilo en las frutillas infestadas (Fig. 6).

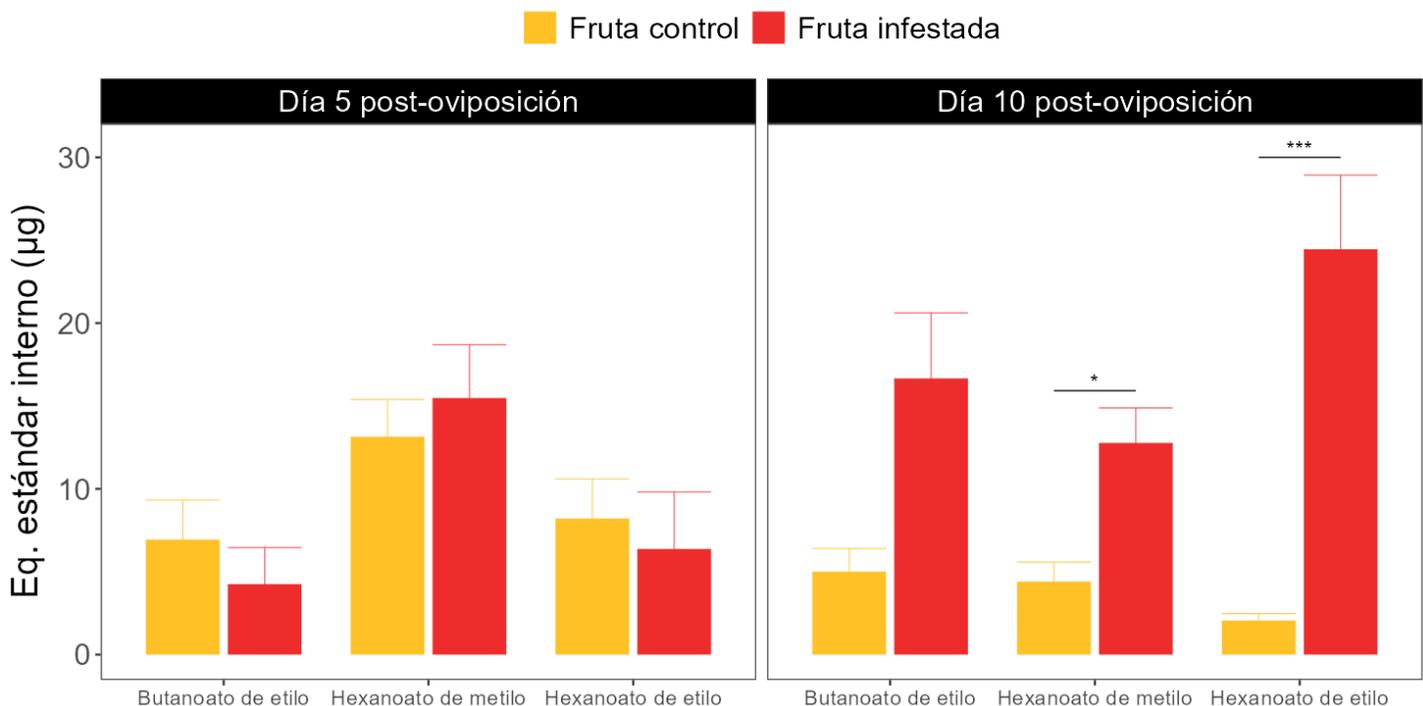


Figura 6. Cuantificación de los ésteres mayoritarios conforme progresa la maduración de la frutilla con la infestación de *Drosophila suzukii*. Los colores diferencian entre tratamientos; plantas infestadas (rojo) y plantas libres de infestación (amarillo), y los paneles clasifican según el tiempo transcurrido desde la infestación; 5 días (izquierdo) y 10 días (derecha). Las barras representan el promedio relativo a la cantidad de estándar interno, tridecano \pm error estándar. Los asteriscos (*) indican la significancia estadística, $p\text{-valor} < 0,05$ (*) y $p\text{-valor} < 0,001$ (***), resultante de modelos lineales mixtos.

La interacción entre el tiempo y los tratamientos del modelo para butanoato de etilo muestra significancia estadística ($F = 7,9915$, $p\text{-valor} = 0,0116$). Sin embargo, el contraste pareado indica diferencias estadísticas marginales entre el tiempo para las plantas infestadas asociadas a un incremento en la cantidad emitida ($T\text{-ratio} = -2,799$, $p\text{-valor} = 0,0544$), y entre tratamientos al décimo día favorable a las frutillas infestadas ($T\text{-ratio} = -2,741$, $p\text{-valor} = 0,0609$). Entretanto, para hexanoato de metilo, el modelo muestra significancia estadística para ambas variables, tiempo y tratamiento ($F = 12,4258$, $p\text{-valor} = 0,0026$ y $F = 10,3974$, $p\text{-valor} = 0,0050$, respectivamente), mas no para su interacción ($F = 1,6733$, $p\text{-valor} = 0,2131$). La comparación múltiple de a pares resulta en una reducción estadísticamente significativa para las plantas libres de infestación a través del tiempo ($T\text{-ratio} = 3,398$, $p\text{-valor} = 0,0163$), y una diferencia significativa entre tratamientos al décimo día hacia las plantas infestadas ($T\text{-ratio} = -3,424$, $p\text{-valor} = 0,0155$). A su vez, la cantidad de hexanoato de metilo presente en las plantas infestadas al día 5 es superior respecto al de las plantas libres de infestación al día 10 ($T\text{-ratio} = 3,205$, $p\text{-valor} = 0,0243$). Por último, el modelado de la cantidad de hexanoato de etilo entre tratamientos y en función del tiempo, muestra significancia estadística tanto para cada una de las variables explicativas ($F = 8,8103$, $p\text{-valor} = 0,0086$ y $F = 8,7682$, $p\text{-valor} = 0,0087$, respectivamente) como para su interacción ($F = 15,9700$, $p\text{-valor} = 0,0009$). El contraste de a pares entre estas variables denota diferencias estadísticas marginales en las plantas control asociadas a una reducción ($T\text{-ratio} = 2,796$, $p\text{-valor} = 0,0548$) y un incremento estadísticamente significativo en las plantas infestadas a través del tiempo ($T\text{-ratio} = -3,199$, $p\text{-valor} = 0,0245$). La comparación entre tratamientos al décimo día muestra la mayor diferencia cuantitativa para hexanoato de etilo ($T\text{-ratio} = -4,948$, $p\text{-valor} = 0,0006$). Asimismo, esta cantidad del compuesto en las plantas infestadas al décimo día es significativamente superior respecto a las plantas control a tiempo medio ($T\text{-ratio} = -3,224$, $p\text{-valor} = 0,0233$).

Olfatometría de *Trichopria anastrephae* a VOCs de frutilla

En una primera instancia, evaluamos la preferencia de *T. anastrephae* ante los compuestos volátiles de frutillas en planta con 10 días de infestación por *D. suzukii* en relación a los de frutillas sanas ($n = 23$) (Fig. 7). Se observó una movilidad alta en los insectos, el 85% de los mismos ingresó al dispositivo y optó por una de las opciones. Los tres parámetros analizados (primera y última elección, y el tiempo de permanencia en cada sección del dispositivo) resultaron favorables a los olores de fruta asociados a la presencia del hospedero. La primera elección y el tiempo de permanencia presentaron sustento estadístico, $p\text{-valor} = 0,002$ (test binomial exacto) y $p\text{-valor} = 0,034$ (test de Wilcoxon, $V = 121$), respectivamente. En promedio, las avispas

permanecieron 115 ± 14 segundos en la sección del estímulo y 30 ± 14 segundos en la sección de control. Entretanto, la tendencia a favor del estímulo en relación a la posición final del insecto carece de significancia estadística (test binomial exacto, p-valor = 0,1196).

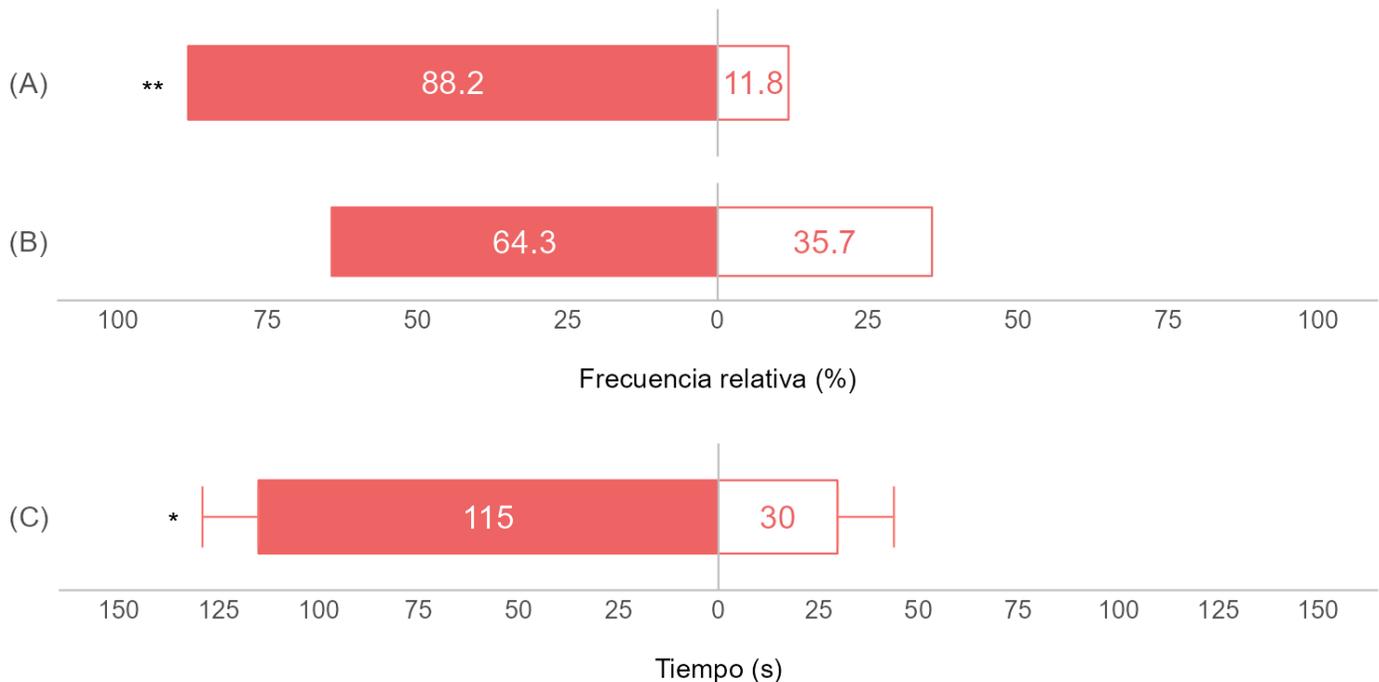


Figura 7. Respuesta de *Trichopria anastrephae* en olfactómetro de doble opción hacia volátiles de frutilla con 10 días de infestación por *Drosophila suzukii* (rojo) y madurada naturalmente (blanco). En orden descendente, (A) primera elección, (B) posición final a los tres minutos de evaluación y (C) el tiempo de permanencia promedio en cada sección del dispositivo con sus respectivos errores estándar. Los asteriscos (*) indican la significancia estadística, p-valor < 0.05 (*) y p-valor < 0.01 (**), resultante del test binomial exacto y del test de Wilcoxon.

A continuación, evaluamos la atractividad del estímulo químico preferido anteriormente dispensado en solución de hexano, utilizando el solvente como control de la estimulación (n = 61) (Fig. 8). En este caso, la movilidad de los insectos fue del 50 % y, en términos generales, se observa la misma tendencia favorable al estímulo mas no tan pronunciada en relación al resultado anterior. Tanto la primera elección como la posición final presentan una tendencia estadísticamente significativa hacia el estímulo (test binomiales exactos, p-valor = 0,0328 y p-valor = 0,0038, respectivamente). Por su parte, el tiempo promedio de permanencia en la sección del dispositivo por donde procede el estímulo fue de 93 ± 11 segundos y de 52 ± 10 segundos en el respectivo control, siendo marginalmente superior en el primero (test de Wilcoxon, p-valor = 0,0984, V = 809).

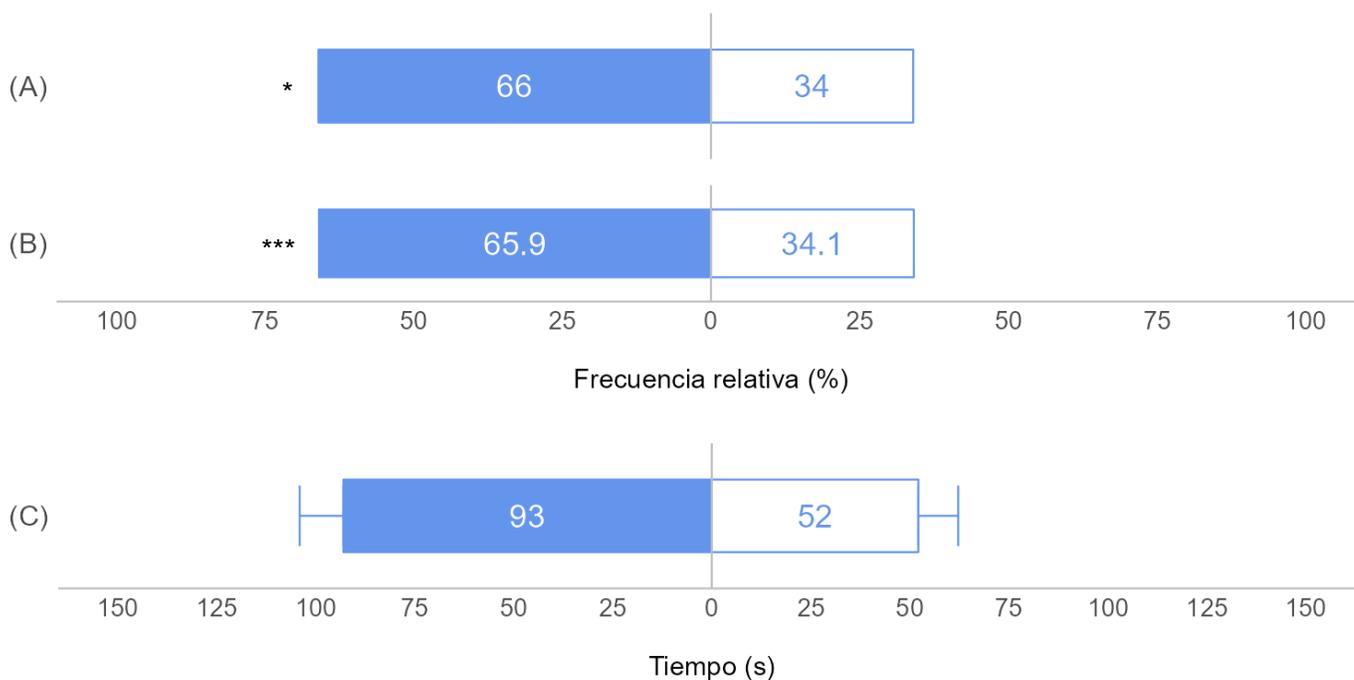


Figura 8. Respuesta de *Trichopria anastrephae* en olfatómetro de doble opción hacia volátiles de frutilla con 10 días de infestación por *Drosophila suzukii* en solución de hexano (azul) y al solvente (blanco). En orden descendente, (A) primera elección, (B) posición final y (C) tiempo de permanencia promedio en cada sección del dispositivo con su respectivo error estándar. Los asteriscos (*) indican la significancia estadística, p-valor < 0,05 (*) y p-valor < 0,001 (***), resultantes de test binomiales exactos.

Electrofisiología de *Trichopria anastrephae* a VOCs asociados a *Drosophila suzukii*

Los resultados comportamentales anteriormente descritos indican la presencia de compuestos volátiles electrofisiológicamente activos a nivel periférico, cuya detección permite discriminar entre los distintos estímulos y son los responsables parciales de la atractividad para las avispas. En este sentido, los extractos de volátiles de las frutillas a ambos tiempos posteriores a la infestación por *D. suzukii* fueron evaluados a través de ensayos de GC-EAD. Ambos perfiles químicos contienen ésteres activos a nivel de las antenas del parasitoide (Fig. 9).

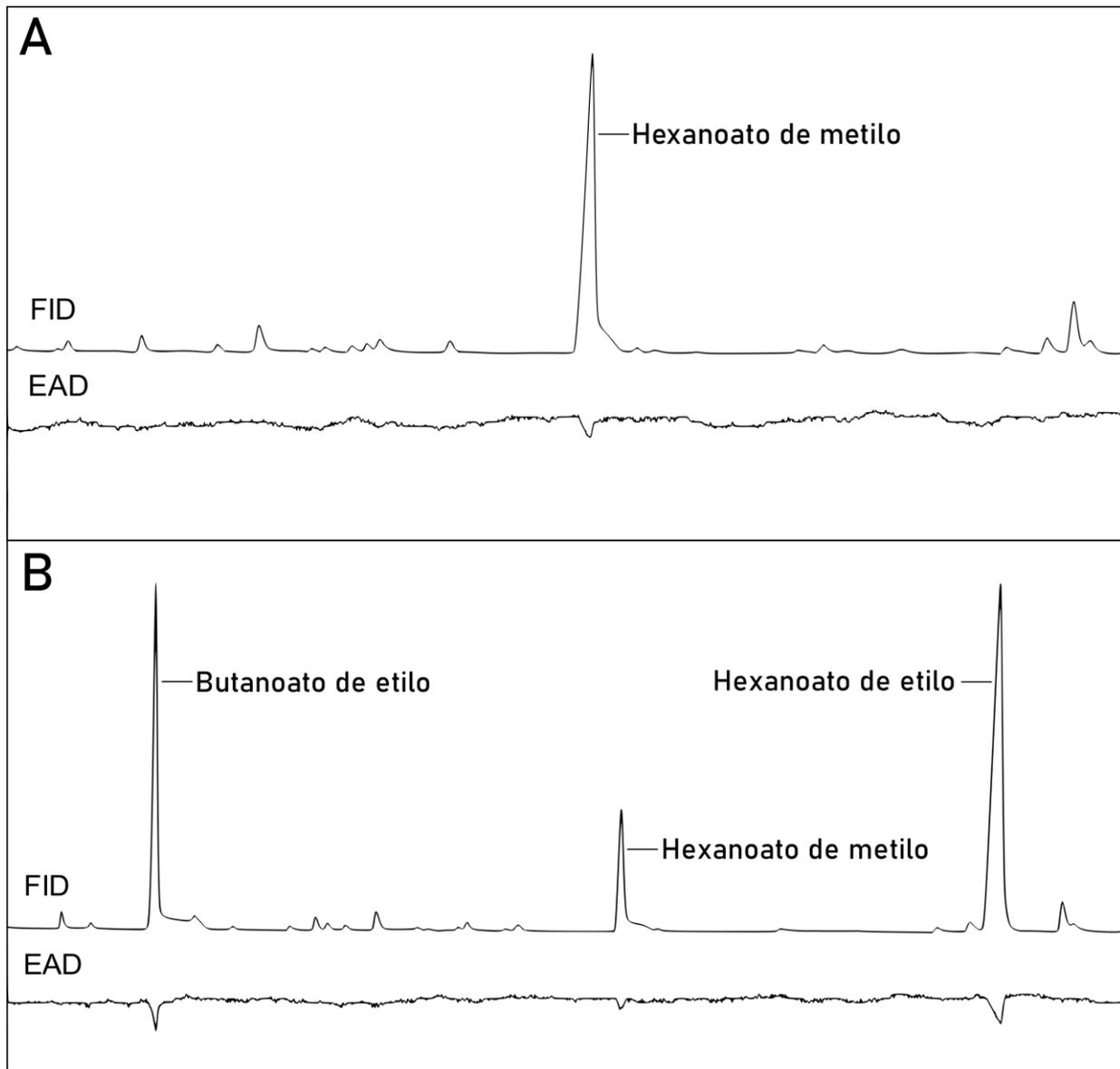


Figura 9. Detección electroantenográfica (GC-EAD) de hembras de *Trichopria anastrephae* a los VOCs de frutillas infestadas por *Drosophila suzukii*. A: VOCs de frutillas 5 días post-infestación y B: VOCs de frutillas 10 días post-infestación. En A y B, el trazo superior corresponde al detector del GC (FID) y los trazos de EAD a señales de electroantenograma representativas de *T. anastrephae*. Los compuestos mayoritarios fueron identificados a través de GC-MS. En A, el hexanoato de metilo fue el compuesto mayoritario (tiempo de retención: 6,28 min); mientras en B fueron los compuestos etílicos, butanoato de etilo y hexanoato de etilo (3,77 y 8,32 min, respectivamente).

Los ésteres etílicos a los 5 días posteriores a la infestación de la fruta se encuentran a bajas cantidades (Fig. 9A), siendo la elevada cantidad de hexanoato de metilo la única señal detectada a este tiempo ($30,5 \pm 25,5 \mu\text{V}$) (promedio \pm desvío estándar) ($n = 19$). Al décimo día posterior a

la infestación (Fig. 9B), la cantidad incrementada por sobre los umbrales de detección de los ésteres etílicos, butanoato de etilo ($65,1 \pm 21,0 \mu\text{V}$) y hexanoato de etilo ($60,4 \pm 16,0 \mu\text{V}$), cambian la dominancia del perfil y adicionan dos señales de mayor amplitud, además de la señal ahora disminuida a hexanoato de metilo debido a su reducción en cantidad ($12,3 \pm 15,5 \mu\text{V}$) ($n = 20$).

El hexanoato de etilo es el compuesto de mayor incremento a través del tiempo (regresión lineal simple, p -valor = 0,0245) y diferenciación entre tratamientos al décimo día (regresión lineal múltiple, p -valor = 0,0006) (Fig. 6). Dada su dinámica de emisión durante la progresión de la maduración y el desarrollo de *D. sukukii*, parte de su utilización como clave puede estar dada por la capacidad de la avispa para detectar cambios cuantitativos del compuesto. Por esta razón, fue utilizado para evaluar la relación dosis-respuesta. Además, fue útil como insumo para establecer la dosis de compuesto en los posteriores bioensayos de condicionamiento olfativo (Fig. 10).

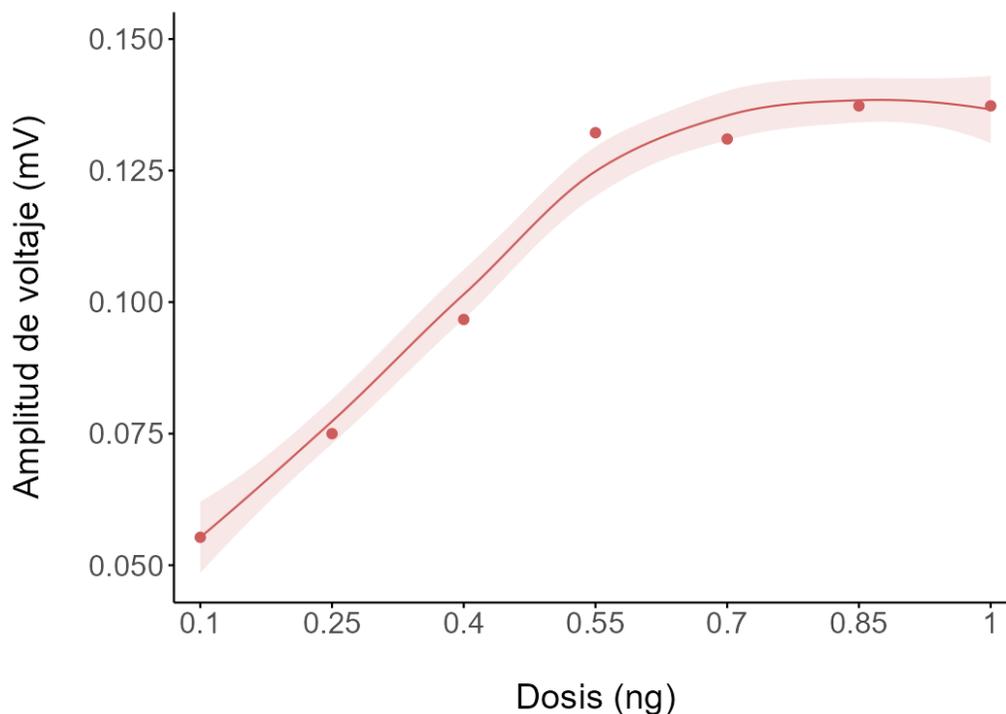


Figura 10. Detección electroantenográfica (GC-EAD dosis-respuesta) de hembras de *Trichopria anastrephae* a hexanoato de etilo. Regresión de la respuesta de EAD (amplitud de voltaje) a incrementos de 0,15 ng de la estimulación olfativa. La banda sombreada indica el intervalo de confianza 95 % ($n = 8$ antenas).

Al incrementar cinco veces la masa de compuesto (de 0,1 a 0,5 ng), la amplitud de la respuesta aumenta linealmente tres veces su magnitud, y a partir de los 0,5 ng se alcanza la saturación de

la detección, donde la respuesta permanece invariable al continuar incrementando la dosis (Fig. 10). La relación dosis-respuesta puede ser modelada a través de una función logística de tres parámetros;

$$Respuesta = \frac{a + 1}{1 + e^{c*(b-dosis)}}$$

Los resultados obtenidos hasta el momento permitieron aproximar el dosaje para los procedimientos de condicionamiento olfativo de *T. anastrephae*. En estos experimentos, evaluamos la posibilidad de modificar el comportamiento de la avispa según las experiencias olfativas tanto durante el desarrollo pre-imaginal como en la etapa adulta. En ambos casos, implicaba una evaluación comportamental post-condicionamiento y análisis semejante al descrito en esta sección. Los siguientes resultados fueron analizados en base a la primera elección por ser una de las variables determinantes en los ensayos de olfatometría descritos con anterioridad.

Condicionamiento pre-imaginal de *Trichopria anastrephae*

En la figura 11, se observa cómo la exposición de los estadios inmaduros de *T. anastrephae* a hexanoato de etilo no condiciona la respuesta hacia este compuesto al ser ofrecido durante la etapa adulta de la hembra a temprana edad. Las avispas *naïves* no muestran preferencia alguna por el hexanoato de etilo ($n = 18$; test binomial exacto, p -valor = 1), y las expuestas al estímulo durante la totalidad del desarrollo holometábolo responden de manera semejante a la estimulación olfativa, inclusive con una mínima preferencia insignificante a preferir el brazo control ($n = 41$; test binomial exacto, p -valor = 0,7552) (Fig. 11).

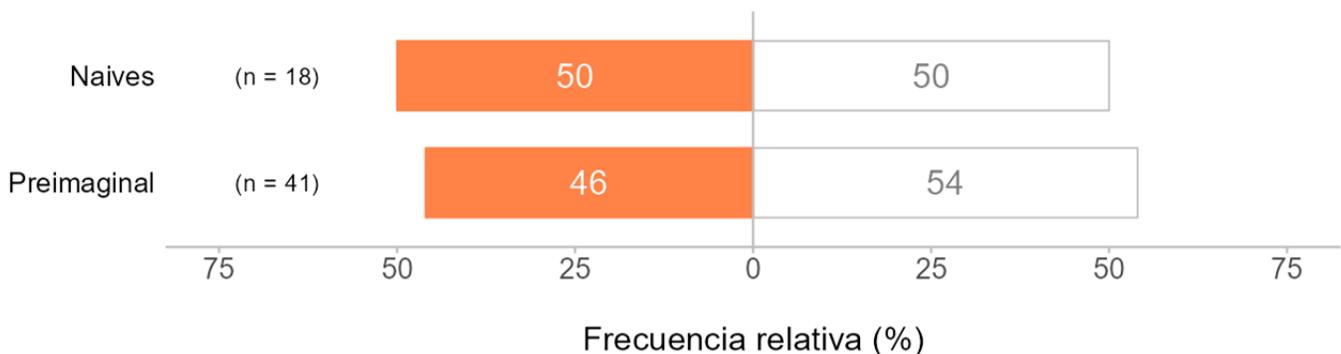


Figura 11. Primera elección de *Trichopria anastrephae* con distinta experiencia olfativa pre-imaginal en olfatómetro de doble opción hacia hexanoato de etilo. La barra superior representa la respuesta de avispas *naïves* (sin exposición a hexanoato de etilo) y la barra inferior a las expuestas durante el desarrollo inmaduro. El brazo del estímulo se representa con barras coloreadas en naranja (izquierda) y el brazo control sin relleno (derecha).

Aprendizaje asociativo de *Trichopria anastrephae*

Las avispas parasitoides sin exposición previa a hexanoato de etilo (septo vacío, cargado con hexano, y expuestas a este último sumado a la experiencia de oviposición) muestran una aversión a las dosis de hexanoato de etilo utilizadas (1000 ng), con una preferencia determinante y estadísticamente significativa por el brazo control del olfatómetro (test binomiales exactos, p-valores = $4,172e^{-07}$; $7,451e^{-09}$; $5,648e^{-06}$, respectivamente) (Fig. 12).

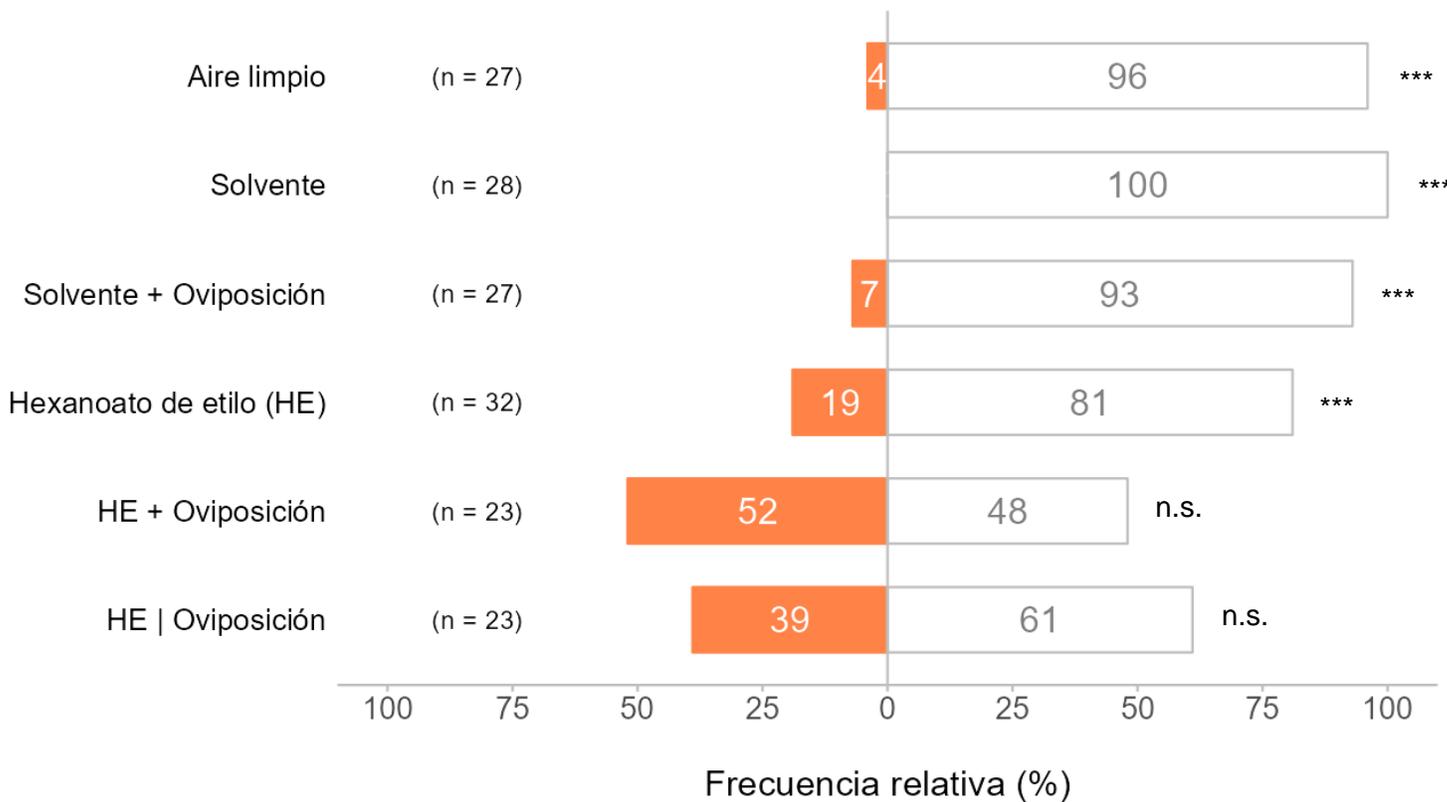


Figura 12. Primera elección de *Trichopria anastrephae* bajo distintas experiencias olfativas en olfatómetro de doble vía en respuesta a hexanoato de etilo. Cada barra horizontal representa uno de los tratamientos del parasitoide. El brazo del estímulo se corresponde con las barras coloreadas en naranja (izquierda) y las barras sin relleno con el brazo control (derecha). Los asteriscos (*) indican la significancia estadística, p-valor < 0,001 (***), y la falta de significancia (n.s.), resultante de test binomiales exactos.

Por su parte, las avispas expuestas únicamente a la estimulación olfativa (septo cargado con 1000 ng de hexanoato de etilo) muestran una respuesta semejante menos pronunciada (test binomial exacto, p-valor = $5,351e^{-04}$) respecto a los controles anteriores (Fig. 12). Sin embargo, la exposición a hexanoato de etilo además del acceso a hospederos, tanto de manera simultánea como desfasados en el tiempo, modifica la respuesta aversiva por el estímulo olfativo y

desaparece la preferencia por el brazo control (Fig. 12). El tratamiento que consiste en la presentación conjunta de hexanoato de etilo con hospederos se observa la mayor tendencia no significativa por el estímulo (52 %; test binomial exacto, p-valor = 1), entretanto la segregación temporal disminuye la respuesta a la clave olfativa (39 %; test binomial exacto, p-valor = 0,4049). De esta manera, observamos cómo las preferencias olfativas de las hembras de *T. anastrephae* cambian acorde a la experiencia olfativa con hexanoato de etilo en asociación a la oportunidad de oviposición durante etapas tempranas de la adultez.

Discusión

Este capítulo abordó la capacidad de detección y utilización de semioquímicos volátiles frutales resultantes de la actividad de un potencial hospedero por parte de *T. anastrephae*. Los resultados muestran cómo el desarrollo de *D. suzukii* dentro de las frutillas altera la emisión de VOCs de la fruta, y que esta diferencia es detectada por el sistema olfativo periférico, resultando atractiva para las hembras de *T. anastrephae* en ensayos de olfatometría. El perfil aromático de las frutillas de la variedad Yrupé (*Fragaria x ananassa*) está representado mayormente por ésteres de cadena corta, con butanoato de etilo, hexanoato de metilo y hexanoato de etilo como compuestos predominantes. Las frutillas infestadas por parte de *D. suzukii* presentan una emisión incrementada de hexanoato de etilo y sostenida de hexanoato de metilo, conforme la plaga se desarrolla en el interior de la fruta. Los resultados de olfatometría demuestran la capacidad de las hembras de *T. anastrephae* para discriminar entre los perfiles aromáticos de frutillas infestadas por *D. suzukii* respecto a las frutillas libres de infestación, y de orientación en base a estas claves químicas. Dada que las claves olfativas son las únicas que pueden explicar el resultado en el olfatómetro, esta preferencia comportamental requiere la detección electroantenográfica (de al menos uno) de los tres ésteres principales mencionados con anterioridad, y que comprobamos experimentalmente. A su vez, estudiamos la plasticidad comportamental de *T. anastrephae* en base a distintas experiencias olfativas con hexanoato de etilo sintético (compuesto mayoritario y detectado periféricamente). La exposición al compuesto durante la holometabolía no sensibiliza la respuesta comportamental de hembras a temprana edad (estímulo neutro), entretanto, la experiencia olfativa sumada a la oportunidad de oviposición durante la etapa adulta *T. anastrephae* modifica las preferencias olfativas (neutraliza la aversión) en las subsecuentes presentaciones del estímulo, demostrando la capacidad de aprender asociativamente.

El aroma de las frutas es determinado mayormente por la mixtura de ésteres volátiles (Mostafa et al., 2022). La síntesis enzimática de estos ésteres frutales se produce a partir de precursores lipídicos o aminoácidos (Yan et al., 2018), y son alternativamente producidos por microorganismos (Park et al., 2009). El perfil aromático de las frutillas (*Fragaria* spp.) está especialmente constituido por esta clase de compuestos (Dong et al., 2013; Yan et al., 2018). Los ésteres butanoato de etilo, hexanoato de metilo y hexanoato de etilo, son compuestos ubicuos dentro de las frutas, encontrados frecuentemente en los sustratos de oviposición utilizados por *D. suzukii* (Revadi et al., 2015). Las variedades cultivables de frutilla suelen tener mayores concentraciones de estos tres ésteres en relación a la especie silvestre, *Fragaria vesca*

(Dong et al., 2013). Esta tendencia posiblemente obedezca a las propiedades organolépticas asociadas a dichos compuestos, valoradas comercialmente e influyentes en el proceso selectivo durante el desarrollo de las variedades. En términos cuantitativos, la emisión de cada uno de los ésteres en frutillas es inherente a la variedad del cultivar (Dong et al., 2013). Además, los ésteres son frecuentemente acumulados durante el avance de la maduración de la fruta (Mostafa et al., 2022). De acuerdo con Keeseey y colaboradores (2015), la emisión de hexanoato de metilo antecede a la de hexanoato de etilo, siendo detectado en cantidades mínimas durante el pintado rojizo de la fruta. Cuando la frutilla completa su coloración rojiza, el hexanoato de metilo domina el perfil de volátiles y es secundado por hexanoato de etilo, relación que se invierte conforme progresa la maduración (Keeseey et al., 2015). Nuestros resultados muestran una dinámica similar para hexanoato de etilo en las frutillas infestadas por *D. suzukii*, ante una emisión sostenida de hexanoato de metilo. Dentro de los compuestos frutales, los ésteres metílicos y etílicos están correlacionados positivamente con el contenido de azúcares de la fruta (Nevo et al., 2019, 2022). Por su parte, las frutillas presentan un gran incremento del contenido total de azúcares desde el pintado rojizo de la fruta (Basson et al., 2010). En este sentido, la sucesión de estos ésteres podría estar correlacionada con el progreso de la maduración de la fruta. Las adaptaciones sensoriales de *D. suzukii* para la utilización de frutas en proceso de maduración como sustrato de oviposición involucran la valuación del contenido de azúcar (Baena et al., 2022; Cavey et al., 2023). No obstante, la preferencia de *D. suzukii* por sustratos de oviposición con alto contenido de azúcares es menor en relación a la exhibida por *D. melanogaster* (Wang et al., 2022). Por lo tanto, estos tres ésteres y sus proporciones podrían ser indicadores del estado de maduración o infestación de la fruta, y advertir indirectamente la condición del sustrato relacionado a la presencia probable de hospederos. Los parasitoides de drosófilidos dependen obligadamente de estadios inmaduros avanzados de especies frugívoras, cuyo desarrollo está estrechamente asociado al progreso de maduración de la fruta, en particular de sus aromas y, por lo tanto, podrían actuar como claves químicas potenciales durante la búsqueda de hospederos por parte de *T. anastrephae*.

Dicha alteración de la emisión de VOCs es utilizada por las hembras de *T. anastrephae* como clave química durante la toma de decisiones del organismo, potencialmente durante el comportamiento de búsqueda de hospederos. En el mismo sistema tri-trófico, Krüger y colaboradores (2023), demostraron cómo el desarrollo del hospedero en frutillas acentúa la preferencia por el sustrato por parte de *T. anastrephae*. Anteriormente, reportamos una capacidad semejante para diferenciar entre arándanos dañados por *D. suzukii* y arándanos libres

de daño (de la Vega et al., 2021). Por lo tanto, *T. anastrephae* discrimina y se orienta a través de claves olfativas de manera innata hacia distintas frutas cultivables utilizadas por *D. suzukii* (de la Vega et al., 2021; Krüger et al., 2023). Esta capacidad adquiere relevancia en estrategias de control biológico aumentativas donde las liberaciones pueden distar de la posición del hospedero. Asimismo, resultados similares han sido demostrados para *T. drosophilae* hacia múltiples especies de frutos silvestres no cultivables (Wolf et al., 2020). De la misma manera, distintas especies de parasitoides de larvas de *Drosophila spp.* resultan atraídas por los VOCs de sustratos infestados (Biondi et al., 2021). A esta preferencia olfativa de los parasitoides hacia sustratos asociados a su hospedero, extensamente probada, subyace una asimetría a nivel de la química volátil de los sustratos bajo frugivoría, escasamente comprobada (Giorgini et al., 2024; de la Vega et al., 2021). Nuestros resultados no advierten la presencia de compuestos asociados al hospedero *per se*, sino una consecuencia de su actividad durante el desarrollo. La incidencia de insectos herbívoros en la emisión de VOCs de tejidos vegetativos de plantas y sus implicancias ecológicas han sido extensamente probada en una multiplicidad de casos (Das et al., 2013), y en menor medida en los sustratos de especies frugívoras (de la Vega et al., 2021; Giorgini et al., 2024).

A su vez, la dinámica de emisión de ésteres durante la maduración de la fruta bajo frugivoría es percibida por el sistema olfativo periférico de *T. anastrephae* en términos de cantidad e intensidad de aferencias, informando potencialmente sobre el grado de madurez y/o la condición del sustrato. Pese a que la detección es un proceso implícito ante un comportamiento atribuido a claves químicas, la evidencia comportamental mencionada anteriormente carecía de la contraparte fisiológica de la detección periférica (GC-EAD) de parasitoides de especies de *Drosophila*. En particular, esta aproximación constituye la primera evidencia sobre posibles VOCs frutales detectados por una especie de parasitoide de *D. suzukii*. El único abordaje en este sentido, correspondiente a Vet y colaboradores (1990), explora la sensibilidad sensorial producto de la pre-exposición de *Leptopilina heterotoma* (Hymenoptera: Figitidae) a claves volátiles asociadas al sustrato de su hospedero. La aproximación electroantenográfica (EAG/GC-EAD) del bio-controlador permiten identificar posibles semioquímicos moduladores del comportamiento y relevantes para la estructuración trófica en ambientes naturales. La identificación de compuestos fisiológicamente activos brinda una serie de oportunidades para el diseño de estrategias basadas en semioquímicos. Por ejemplo, la manipulación comportamental a través del condicionamiento olfativo de parasitoides para optimizar la búsqueda de hospederos, así como acotar el grado de generalismo a través de una búsqueda más dirigida, y ‘arrestar’ al bio-

controlador en un agro-ecosistema. Asimismo, la identificación de semioquímicos indetectables podría contribuir a la selección de volátiles utilizados en sistemas de trapeo de la especie plaga.

En nuestro caso, la emisión incrementada de hexanoato de etilo fue un diferencial de las frutillas con estadios avanzados del desarrollo de *D. suzukii*. Por ejemplo, en uvas (*Vitis rotundifolia*), la emisión de hexanoato de etilo sucede en la última etapa de maduración (Lee et al., 2016). Esta dinámica de emisión es percibida por parte de *T. anastrephae* a través de la capacidad de detectar cambios cuantitativos del compuesto. Por lo tanto, este compuesto podría ser un indicador de fruta en estado de maduración avanzada de la fruta, y probable hábitat de hospederos alternativos como otras especies de *Drosophila*. Ambos cambios químicos, cualitativos y cuantitativos, pueden resultar informativos e influir en la toma de decisiones de los insectos (Hoballah et al., 2002).

El hexanoato de etilo presentado individualmente no resulta atractivo *per se* a las dosis evaluadas; estímulo neutro (100 ng) y aversivo (1000 ng). La exposición durante el desarrollo completo de *T. anastrephae* a este compuesto no condiciona y/o sensibiliza las preferencias olfativas de las hembras adultas a temprana edad. La ocurrencia de este proceso de aprendizaje presenta escasa demostración, y ha sido particularmente probado para los parasitoides *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Aphidiidae) e *Hyssopus pallidus* (Hymenoptera: Eulophidae) (Gandolfi et al., 2003; Gutiérrez-Ibáñez et al., 2007; Takemoto et al., 2011). Por otro lado, la experiencia asociativa entre la clave olfativa y la oportunidad de oviposición durante la etapa adulta temprana modifica las preferencias olfativas de *T. anastrephae*. En suma, pese a ser perfectibles tanto el protocolo de condicionamiento como la metodología de evaluación para esta especie, la capacidad de aprendizaje puede ser un atributo más a valorar al momento de seleccionar al controlador biológico. Más allá de la habilidad innata de orientación en base a claves químicas asociadas a sustratos infestados, la capacidad de asociar estímulos olfativos durante la adultez puede resultar beneficiosa para la adecuación de la especie. El condicionamiento olfativo del parasitoide podría ser una forma de especializar preferencialmente la búsqueda de hospederos en un determinado cultivo, e incrementar así la incidencia sobre una plaga través de una búsqueda más eficiente y dirigida, redundando eventualmente en una mayor presión y control poblacional de la misma.

Capítulo II:

Caracterización de la capacidad olfativa en la técnica del insecto estéril de *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae)

Resultados

Como parte fundacional de lo requerido en este capítulo, se estableció un protocolo para la obtención de pupas con el mismo grado de desarrollo y la logística para su esterilización. Luego del proceso de irradiación y la posterior disposición en laboratorio, no se observaron diferencias en el porcentaje de emergencia para los tres tratamientos (0, 120 y 220 Gy). De estas, la proporción de sexos se mantuvo equitativa e invariante entre los tratamientos. En términos generales, cada tanda producida de pupas era reducida a la cuarta parte de adultos experimentales producto de la reducción por la emergencia y el sexado.

EAG dosis-respuesta a ésteres frutales de moscas estériles

Los resultados de EAG muestran una relación dosis-respuesta positiva para los tres grupos de machos de *D. sukii* en respuesta a los tres ésteres evaluados, butanoato de etilo, acetato de isoamilo y hexanoato de etilo. A nivel periférico de la olfacción, se observa una tendencia a la baja en la sensibilidad olfativa de los machos estériles conforme se incrementa la dosis de radiación evaluada y acentuada a la máxima dosis evaluada (1000 ng) para butanoato de etilo y acetato de isoamilo. La relación entre la amplitud de voltaje (mV) y la dosis ofrecida de estímulo (ng) puede ser descripta a través de funciones exponenciales.

Para butanoato de etilo, las respuestas medias a la dosis más alta fueron de $4,0 \pm 2,2$; $4,3 \pm 2,6$ y $1,8 \pm 1,3$ mV para los distintos grupos evaluados (0, 120 y 220 Gy, respectivamente) (Fig. 13). La detección a 1000 ng de butanoato de etilo presenta diferencias significativas según la dosis de radiación administrada a las moscas (ANOVA; $F = 4,998$, $p\text{-valor} = 0,012$).

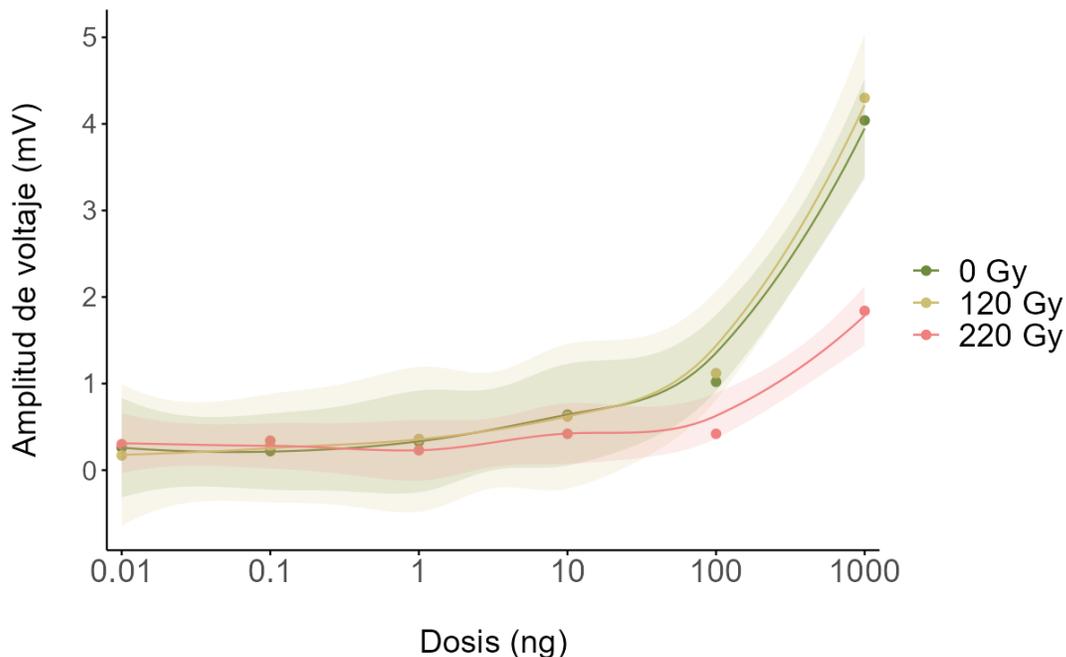


Figura 13. Dosis-respuesta electroantenográfica de machos adultos de *Drosophila sukuzii* expuestos a distintas dosis de radiación a butanoato de etilo. Las dosis de radiación se representan en distintos colores; verde (0 Gy), amarillo (120 Gy) y rojo (220 Gy) (número de réplicas de cada tratamiento: 0 Gy = 14, 120 Gy = 9, 220 Gy = 12).

La disminución de la respuesta en las moscas esterilizadas a 220 Gy es estadísticamente significativa respecto a los restantes tratamientos evaluados (t -ratio = 2,718, p-valor = 0,0315 y t -ratio = 2,722, p-valor = 0,0313, contrastadas con las moscas control (0 Gy) e irradiadas con 120 Gy, respectivamente). Por su parte, la respuesta entre las moscas control (0 Gy) no se diferencia de las moscas esterilizadas a una dosis intermedia de radiación (120 Gy) (t -ratio = -0,306, p-valor = 1).

En cuanto al acetato de isoamilo, las respuestas promedio a la mayor dosis evaluada fueron $4,3 \pm 2,1$ mV para las moscas control (0 Gy), $4,1 \pm 2,2$ y $2,9 \pm 1,4$ mV para las moscas irradiadas (120 y 220 Gy, respectivamente) (Fig. 14). La respuesta en las antenas a dicha dosis de compuesto difiere entre los tratamientos de las moscas (ANOVA; $F = 3,586$, p-valor = 0,041). Sin embargo, esta tendencia a la baja observada en la respuesta de las moscas con mayor exposición a radiación (220 Gy) presenta diferencias marginalmente estadísticas únicamente con las moscas control (0 Gy) (t -ratio = 2,33, p-valor = 0,081), y no se observan diferencias respecto a la dosis de radiación intermedia (120 Gy) (t -ratio = 2,14, p-valor = 0,123). Entretanto, la

respuesta entre las moscas control y aquellas irradiadas con 120 Gy no presenta diferencias (t -ratio = -0,09, p-valor = 1).

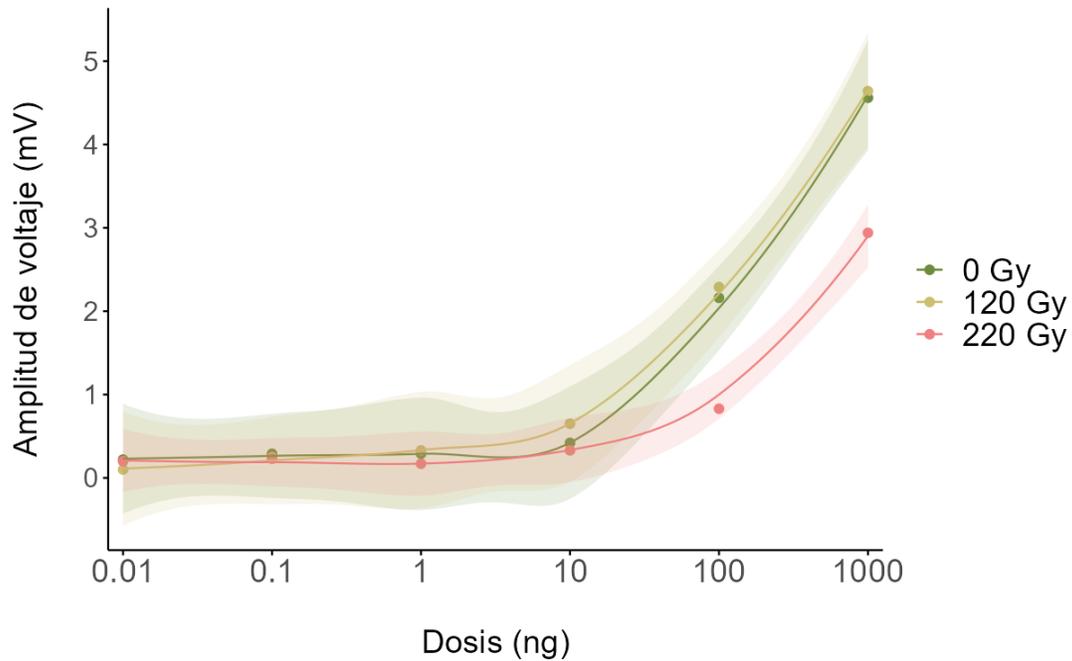


Figura 14. Dosis-respuesta electroantegráfica de machos adultos de *Drosophila sukuzii* expuestos a distintas dosis de radiación a acetato de isoamilo. Las dosis de radiación se representan en distintos colores; verde (0 Gy), amarillo (120 Gy) y rojo (220 Gy) (número de réplicas de cada tratamiento: 0 Gy = 11, 120 Gy = 7, 220 Gy = 13).

La detección hasta los 100 ng de hexanoato de etilo muestran una tendencia y relación entre tratamientos semejantes, sin diferencias estadísticas (ANOVA, p-valor = 0,451) (Fig. 15). Sin embargo, la respuesta a los 1000 ng presenta una inversión en la tendencia observada entre los tratamientos control (0 Gy) y los irradiados a 220 Gy.

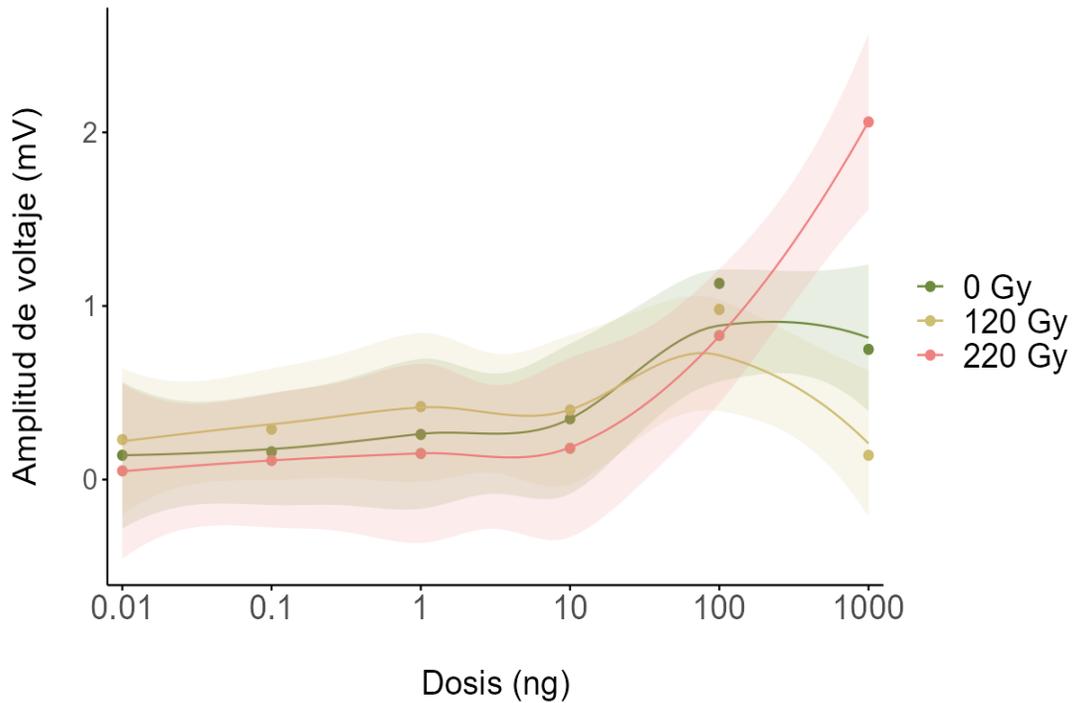


Figura 15. Dosis-respuesta electroantenográfica de machos adultos de *Drosophila suzukii* expuestos a distintas dosis de radiación a hexanoato de etilo. Las dosis de radiación se representan en distintos colores; verde (0 Gy), amarillo (120 Gy) y rojo (220 Gy) (número de réplicas de cada tratamiento: 0 Gy = 5, 120 Gy = 3, 220 Gy = 11).

Orientación de moscas estériles en base a claves olfativas

No obstante, a nivel comportamental no se observan diferencias en las capturas entre los tratamientos de 220 Gy ($n = 15$, 150 individuos) en relación al grupo control ($n = 12$, 120 individuos) a los distintos tiempos evaluados (Fig. 16). La capacidad de orientación en base a claves olfativas fue analizada a través del 'índice de capturas' calculado como la diferencia de capturas entre la trampa con atrayente y la trampa control, sobre el número de individuos evaluados en cada arena experimental (10). La unidad se corresponde con una totalidad de las capturas, y el signo indica cuál de las trampas tuvo una mayor captura; índice > 0 para el estímulo e índice < 0 para la trampa control.

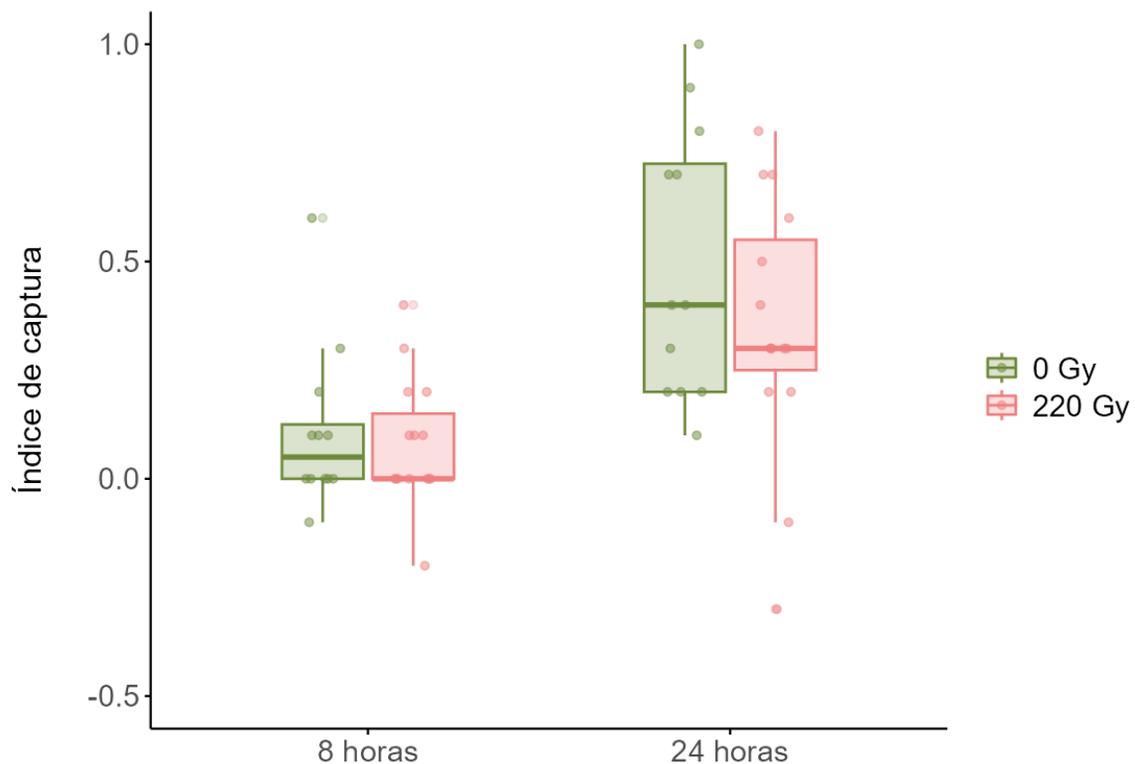


Figura 16. Índice de capturas temporal de machos de *Drosophila suzukii* expuestos a distinta dosis de radiación. Las dosis de radiación se representan en distintos colores; verde (0 Gy) y rojo (220 Gy) ($n = 12$ y $n = 15$, respectivamente), a cada tiempo evaluado, 8 y 24 horas.

Las capturas a los primeros tiempos de revisión (2, 4 y 8 horas de iniciado el ensayo) no superan el 10 % de los individuos y fueron excluidas de la representación gráfica (Fig. 16). Tras las primeras 4 horas, el grupo control ya presentaba un 10 % de captura, mientras los estériles se aproximaban a este valor (8 %) a las 8 horas. Transcurridas las 24 horas, la mitad de los individuos control (49 %) y un tercio (35 %) eran capturados en la trampa con atrayente. El efecto de la radiación en las capturas de insectos fue analizado a través de una aproximación bayesiana con un modelo binomial contrastando los tratamientos (0 Gy vs. 220 Gy), con variables aleatorias como la caja de muestreo, la fecha de realización y el tiempo al cual se midieron las proporciones. Se observa que no existen diferencias entre los tratamientos, esto sugiere que la capacidad de orientación mediada por VOCs no resulta afectada por la radiación ionizante utilizada.

Cuantificación de las sensilias olfativas en las antenas de las moscas estériles

La cuantificación de sensilias fue realizada en un área de 2736 y 2322 μm^2 de la región I y parte de la región IV del funículo (Fig. 17B) de las moscas control (0 Gy) y estériles (220 Gy), respectivamente, donde *D. sukuzii* concentra mayormente las sensilias olfativas cuyas OSNs expresan los ORs para la detección de ésteres frutales (Jeong et al., 2020).

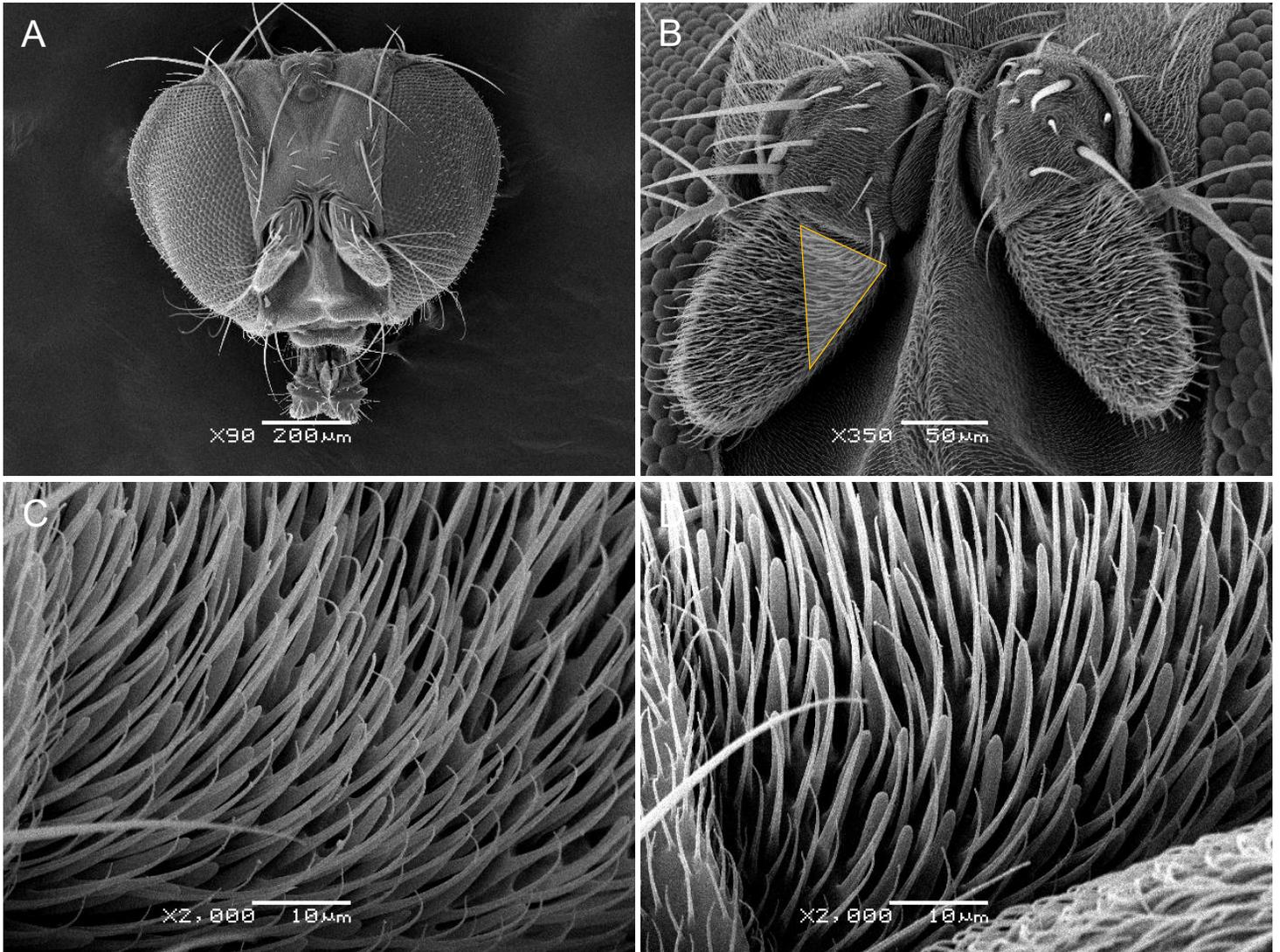


Figura 17. Micrografías electrónicas de barrido de antenas de machos de *Drosophila sukuzii*. (A) Parte frontal de la cabeza (x90). (B) Vista frontal de la parte anterior de las antenas, con la región I y IV del funículo resaltada y contrastada entre moscas control (0 Gy) y estériles (220 Gy) (x350). (C y D) Región de mayor densidad de sensilias basicónicas de *Drosophila* spp. (x2000), (C) moscas controles y (D) estériles, respectivamente. Las barras blancas referencian la escala de observación en micras (μm).

La densidad de sensilias basicónicas fue de 12,7 y 14,0 por mm², y la de sensilias tricoideas 38,8 y 36,3 por mm² para las moscas control y estériles, respectivamente (Fig. 18). No se observan diferencias estadísticas tanto para la densidad de sensilias basicónicas (*t-test*, p-valor = 0,64) como para las sensilias tricoideas (test de Wilcoxon, p-valor = 0,7). En la misma línea, no se evidenciaron malformaciones a nivel de las sensilias olfativas de los machos estériles (220 Gy).

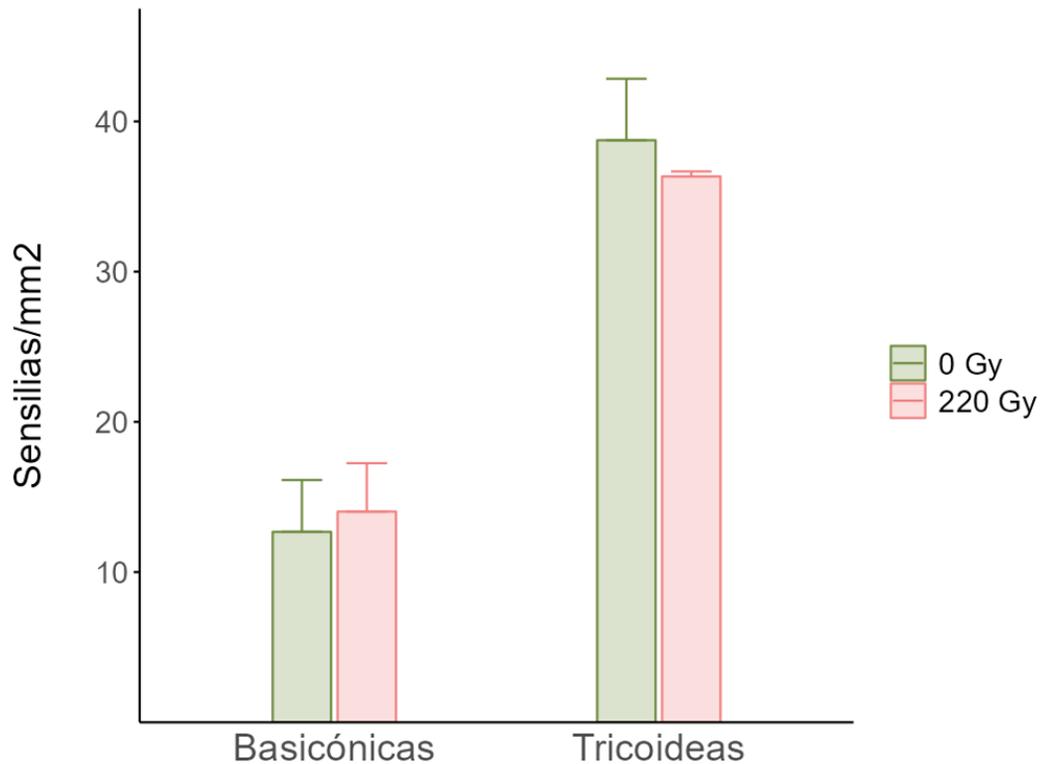


Figura 18. Densidad de sensilias olfativas (basicónicas y tricoideas) a nivel de las antenas de machos de *Drosophila suzukii* expuestos a distinta dosis de radiación. Las dosis de radiación se representan en distintos colores; verde (0 Gy) y rojo (220 Gy) (n = 3, de cada tratamiento).

Discusión

Las curvas dosis-respuesta de EAG de los machos estériles de *D. suzukii* advierte una afección a nivel de la fisiología de la olfacción periférica expuestos a altas concentraciones de estímulo. De todas maneras, la dosis de estímulo a la que se observa dicha afección implica escenarios poco plausibles en ambientes naturales. A modo de referencia, Revadi y colaboradores (2015) cuantificaron la dinámica de emisión de hexanoato de etilo emitido por 200 g de frutillas completamente madura confinada en un sistema de colecta, situándose en el orden de $80,9 \pm 17,7$ ng/hora. Esta cantidad es significativamente menor a la dosis máxima evaluada para la cual se observó una afectación fisiológica a causa de la esterilización. No obstante, a nivel de la morfología de las sensilias olfativas en las antenas, no se observan desviaciones tanto en número como en malformaciones, capaces de explicar la afectación fisiológica observada en las respuestas de EAG. De manera semejante, a nivel comportamental, la capacidad de orientación de las moscas estériles en base a claves olfativas se mantendría inalterada.

El sistema olfativo de los insectos puede ser susceptible a los efectos secundarios de la radiación esterilizante a distintos niveles, fisiológicos y morfológicos-anatómicos. En particular, la respuesta electroantenográfica es un proceso inmaduro durante la pupación tardía y aún a edades tempranas del insecto adulto. En *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae), se observó cómo progresa la maduración en este sentido asociada a un incremento de la sensibilidad (Schweitzer et al., 1976). Oland y colaboradores (1988), demuestran cómo la dosis de radiación esterilizante de *M. sexta* afecta el número de células glía, ocasionando malformaciones de los glomérulos a nivel histológico de la olfacción. En la misma especie, se observa una relación positiva entre la dosis de radiación y la magnitud de las malformaciones de las sensilias (Haza, 2010). Malformaciones semejantes de las sensilias olfativas también se observan en *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (Zahran et al., 2023). En dípteros, existen reportes sobre la incidencia de la radiación en el sistema olfativo. En las antenas de *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae), se observan malformaciones anatómicas y reducciones en el número de sensilias olfativas a las dosis de radiación adecuada para la especie (Ibrahim et al., 2018), y afecciones semejantes son observadas en las sensilias olfativas asociadas al aparato bucal (Zahran et al., 2022). En *Bactrocera zonata* (Diptera: Tephritidae), la morfología y el número de sensilias olfativas de las antenas presentan alteraciones similares consecuencia de la radiación esterilizante (Degwi & Zahran, 2019). En la misma familia de insectos, se han reportado afecciones en el comportamiento olfativo de *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) a causa de la esterilización con radiación (Robacker & Garcia, 1993; Robacker et al., 1990).

Por su parte, los estudios sobre radiobiología en *Drosophila* asociadas a distintas afecciones son vastas, mas no las relativas a nivel del sentido de la olfacción. En *Drosophila*, mutaciones en los co-receptores ORco ocasionan neurodegeneraciones y modificaciones morfológicas del glomérulo post-emergencia (Chiang et al., 2009). Además, las OSNs en *Drosophila* se desarrollan en las primeras 50 horas de pupación (Yan et al., 2020), siendo estos procesos fisiológicos sensiblemente importantes próximos al momento de esterilización de las mismas.

Pese a lo expuesto con anterioridad, se desconoce el impacto de la radiación a nivel de la detección periférica de la olfacción. La sensibilidad olfativa en términos de respuesta de EAG no solo es variable entre las especies, sino que están determinadas por diversos factores a nivel intraespecífico (sexos, morfo-tipos, estatus sexual, entre otros). Bolton y colaboradores (2019), evidencian diferencias en la sensibilidad electroantenográfica entre los sexos de *D. sukukii* a distintos VOCs frutales. La atraktividad fue diferencial entre los sexos únicamente para β -ciclocitral (Bolton et al., 2019). Por otro lado, Kirkpatrick y colaboradores (2018) muestran diferencias sensitivas (EAG) de acuerdo a los morfo-tipos estacionales de hembras de la especie a geosmin, un compuesto volátil emitido por microorganismos, señalado como un 'compuesto de alarma' por su deterrencia. La respuesta disminuida de EAG a geosmin se correlaciona con una pérdida de su efecto deterrente (Kirkpatrick et al., 2018). Por su parte, se observó la misma diferencia en la detección de acetato de isoamilo, mas no resultaba disminuida la respuesta comportamental (Kirkpatrick et al., 2018). Crava y colaboradores (2019) demuestran la expresión diferencial de genes de ORs en las antenas de hembras vírgenes y grávidas asociada a una sensibilización de la respuesta de EAG para acetato de isoamilo. A nivel comportamental, las preferencias olfativas en respuesta a VOCs de fruta difieren entre las hembras vírgenes y grávidas, las primeras prefieren indistintamente sustratos maduros y sobre-maduros, mientras las últimas son más atraídas por los frutos maduros (Rehermann, 2022). A su vez, las preferencias olfativas en el comportamiento de *D. sukukii* pueden estar en función de otras condiciones fisiológicas (Wong et al., 2018).

Los tres ésteres mayoritarios emitidos por las frutillas de la variedad Yrupé (butanoato de etilo, hexanoato de metilo y hexanoato de etilo), así como el acetato de isoamilo, son detectados a nivel del sistema olfativo periférico de *D. sukukii* (Revadi et al., 2015). Cloonan y colaboradores (2018), propusieron que el sitio de cópula podría estar asociado a fruta sobre-madura y/o fermentativa. Como fue mencionado anteriormente, existe una relación positiva entre los ésteres del perfil aromático de la fruta y el contenido de azúcares, siendo un indicador (in)directo de la calidad del sustrato y el grado de maduración de la fruta (Nevo et al., 2019, 2022). En este

sentido, los ésteres evaluados son claves químicas fidedignas sobre la presencia de sustratos de oviposición para las hembras, y antecesores de eventuales sitios de cópula (Cloonan et al., 2018).

A su vez, están identificadas las OSNs alojadas en las sensilias basicónicas largas responsables de la detección de dichos ésteres (Keeseey et al., 2015). Por su parte, el acetato de isoamilo es un éster ubicuo en las frutas, particularmente en los sustratos de oviposición de *D. suzukii* y activo a nivel de las antenas (Cloonan et al., 2018). La relación dosis-respuesta de la detección periférica a dichos compuestos es conocida (Bolton et al., 2019). Los mismos autores, observan una débil atracción comportamental en ambos sexos hacia los ésteres, acetato de isoamilo y hexanoato de etilo, presentados individualmente, y un efecto sinérgico en combinación con β -ciclocitral, un compuesto de las hojas de frutillas, detectado exclusivamente por *D. suzukii* y atractivo para la especie (Keeseey et al., 2015). Según Piñero y colaboradores (2019), el acetato de isoamilo y β -ciclocitral resulta atractivo para las hembras al ser ofrecidos individualmente mas no para los machos de *D. suzukii*. Sin embargo, el efecto sinérgico de la combinación de ambos compuestos se observa únicamente para los machos de la especie. Los ésteres individuales, butanoato de etilo y acetato de isoamilo, serían atractivos para las hembras grávidas (Urbaneja-Bernat et al., 2021).

Existe una relación entre la intensidad de la respuesta de EAG, sea debido a la cantidad de estímulo o alteraciones en la arquitectura fisiológica de la olfacción del insecto, y las respuestas comportamentales exhibidas por los insectos a estas claves químicas. En esta última, la esterilización de los insectos con radiación produce efectos secundarios a nivel sensorial de la detección, con posibles implicancias en la ecología química de estos organismos en condiciones naturales. La SIT basa su efectividad, en gran medida, en la competitividad de los machos estériles. La liberación de estos puede distar de los sitios naturales de cópula, por lo que deberán ser competentes, a su vez, en la búsqueda de estos sitios, potencialmente optimizada a través de semioquímicos volátiles. En este sentido, la evaluación de los efectos subletales de la olfacción producto del proceso de esterilización buscaba evaluar cuán comprometido resulta este sentido con el dosaje de radiación recomendado para la esterilización de la especie y, por transitiva, la eficacia de la SIT aplicada en *D. suzukii*. Sin embargo, el efecto negativo de la radiación a nivel sensorial podría carecer de relevancia ecológica y, por consiguiente, no afectaría la efectividad de la SIT. Por su parte, el abordaje de esta línea de investigación sentó un precedente en Uruguay en el uso de técnicas nucleares con el objetivo de esterilizar insectos, visibilizando una herramienta a disposición para la generación de bio-insumos en el país.

Perspectivas

Capítulo I: Claves químicas asociadas a la búsqueda de hospederos del parasitoide de *Drosophila suzukii*, *Trichopria anastrephae* (Hymenoptera: Diapriidae)

- La disposición la técnica de detección electroantenográfica para avispas microhimenópteras de especies de *Drosophila* permite relevar la respuesta hacia VOCs de otros sustratos frutales. A su vez, se podrían estudiar posibles modificaciones en la sensibilidad producto de los procesos de condicionamiento olfativo.
- Los resultados obtenidos sobre el aprendizaje asociativo de *T. anastrephae* invitan a explorar la optimización del protocolo de condicionamiento olfativo (estímulo, cantidad, tiempos de exposición y de latencia, entre otros aspectos). Una vez establecido el protocolo de aprendizaje, se puede evaluar la eficiencia de búsqueda de los parasitoides 'entrenados' tanto en laboratorio como en condiciones naturales.
- Explorar una posible sensibilización a nivel de la detección periférica a causa del aprendizaje olfativo como la propuesta por Vet y colaboradores (1990) para *Leptopilina heterotoma* (Hymenoptera: Figitidae).

Capítulo II: Caracterización de la capacidad olfativa en la técnica del insecto estéril de *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae)

- Ampliar el número de réplicas de los experimentos de esterilidad-fertilidad para resolver incongruencia de nuestros resultados. Según estos, las moscas esterilizadas con dosis de 120 y 220 Gy tendrían niveles de esterilidad similares, mientras los de 220 Gy perderían capacidades olfativas en comparación a las moscas controles (0 Gy). Lo primero no es del todo correcto, por literatura sabemos que las moscas irradiadas con 120 Gy presentan un remanente de fertilidad contraproducente para la SIT.
- Analizar en mayor detalle las micrografías electrónicas de barrido de la superficie de las antenas de moscas estériles, subclasificar meticulosamente los distintos tipos de sensilias olfativas, cuantificar cada una de estas y describir posibles malformaciones.
- Evaluar la respuesta comportamental en condiciones de mayor naturalidad, en respuesta a claves del sustrato y con presencia de hembras.

Epílogo

La tesis abordó dos estrategias alternativas, complementarias y ambientalmente sostenibles, basadas en el uso de bio-controladores para el manejo de *D. suzukii*, una especie frugívora plaga de relevancia mundial. Ambas estrategias, el control biológico tanto con parasitoides como con insectos estériles, dependen ampliamente de cuán eficientes y competitivos sean estos organismos en condiciones naturales. Los insectos en ambientes naturales están expuestos a un sinnúmero de estímulos de distinta naturaleza, los cuales contribuyen a la percepción del entorno donde deben subsistir. Los estímulos de naturaleza química y volátil pueden tener una importante influencia en la adecuación biológica de estos organismos. De la misma manera, los bio-controladores en los agro-ecosistemas apelarán al sentido de la olfacción para la búsqueda de alimento y sitios de reproducción, principalmente. Desde la Ecología Química, abordamos las habilidades competitivas de ambos bio-controladores tanto de las capacidades fisiológicas de la olfacción como de la respuesta a nivel comportamental, para la comprensión de estas interacciones ecológicas donde sientan las bases ambas estrategias de mitigación de plagas.

Apéndice

I. GC-EAD de la avispa parasitoide, *Leptopilina boulardi*

De manera semejante a la descripción metodológica '[Electrofisiología \(EAG/GC-EAD\): Detección periférica de compuestos volátiles](#)' evaluamos la respuesta electroantenográfica (GC-EAD) de la avispa parasitoide, *Leptopilina boulardi* (Hymenoptera: Figitidae) a los extractos de VOCs de frutilla a los 5 y 10 días posteriores a la infestación de *D. suzukii*, asociados a la presencia de estadios larvales y pupales, respectivamente. *Leptopilina boulardi* es una especialista de larvas de *D. melanogaster*, un hospedero naturalmente asociado a sustratos de maduración avanzada y en estado de descomposición. En cambio, la progresión del desarrollo de *D. suzukii*, y en particular los estadios larvales, transcurre aún en fruta madura, bajo perfiles químicos disímiles. En este paso, evaluamos la sensibilidad de *L. boulardi* para detectar VOCs de fruta asociados a la presencia de un hospedero inusual y contrastamos la respuesta olfativa de dos especies de parasitoides cuyos hospederos están asociados a diferentes VOCs en la naturaleza.

Ambas especies de parasitoides, *L. boulardi* y *T. anastrephae*, detectan los compuestos mayoritarios de ambos perfiles de VOCs evaluados (Fig. 19), y con una sensibilidad semejante (Fig. 20). En el caso de *L. boulardi*, la respuesta antenal a la cantidad de hexanoato de metilo presente en las muestras a los 5 días posteriores a la infestación promedió $54,5 \pm 22,3 \mu\text{V}$ (promedio \pm desvío estándar) (Fig. 19A y 20) ($n = 21$). En tanto, para los tres ésteres mayoritarios de las muestras al décimo día, las respuestas fueron de $71,9 \pm 38,5 \mu\text{V}$ para butanoato de etilo, $26,1 \pm 28,1 \mu\text{V}$ para hexanoato de metilo y $72,3 \pm 33,9 \mu\text{V}$ para hexanoato de etilo (Fig. 19B y 20) ($n = 20$).

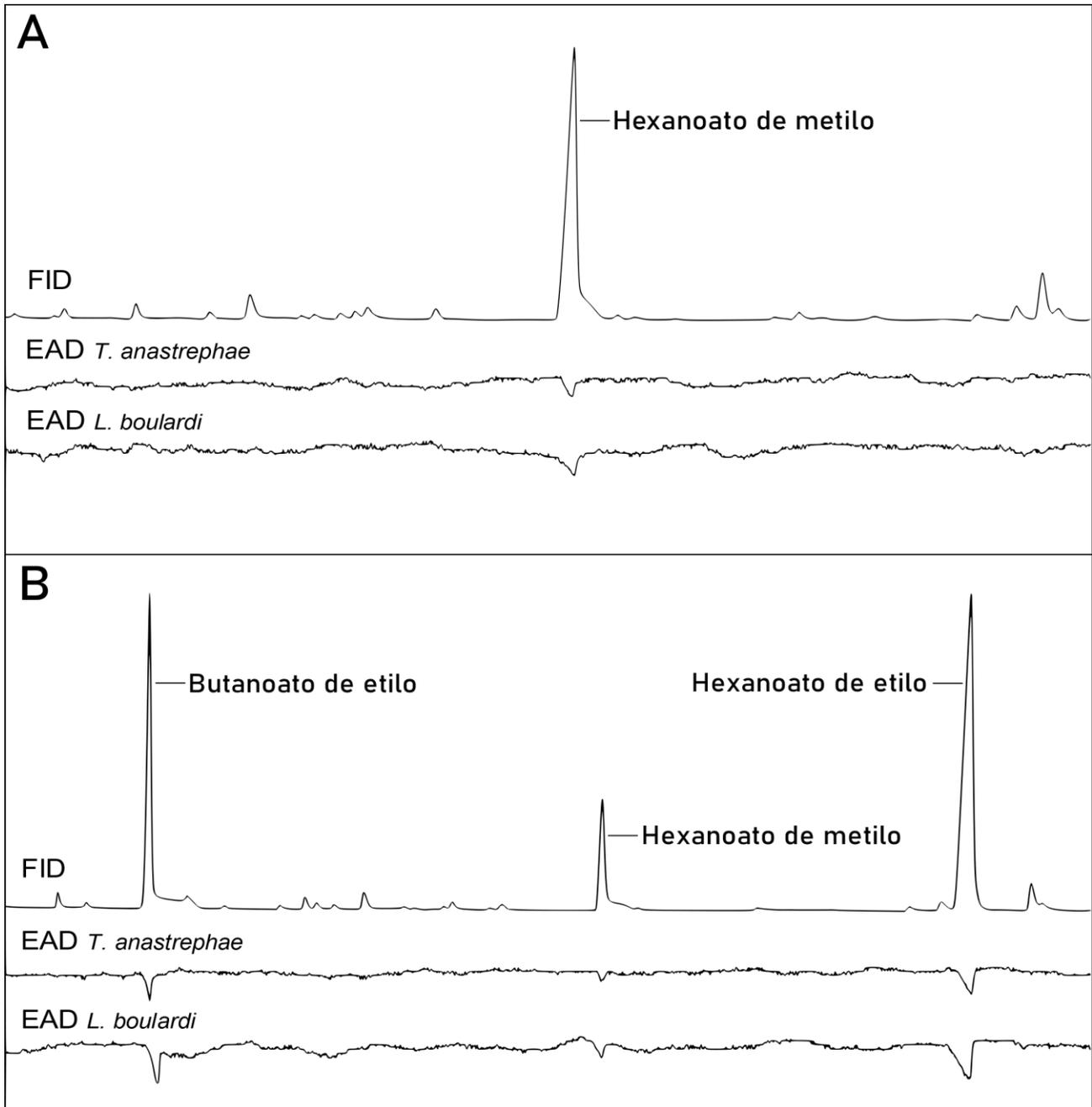


Figura 19. Detección electroantenográfica (GC-EAD) de hembras de *Trichopria anastrephae* y *Leptopilina bouvardi* a VOCs de frutillas infestadas por *Drosophila suzukii*. A: VOCs de frutillas 5 días post-infestación y B: VOCs de frutillas 10 días post-infestación. En A y B, el trazo superior corresponde al detector del GC (FID) y los trazos de EAD a señales de electroantenograma representativas de *T. anastrephae* y *L. bouvardi*, respectivamente. Los compuestos mayoritarios fueron identificados a través de GC-MS. En A, el hexanoato de metilo fue el compuesto mayoritario (tiempo de retención: 6,28 min); mientras en B fueron los compuestos etílicos, butanoato de etilo y hexanoato de etilo (3,77 y 8,32 min, respectivamente).

Leptopilina boulardi Trichopria anastrephae

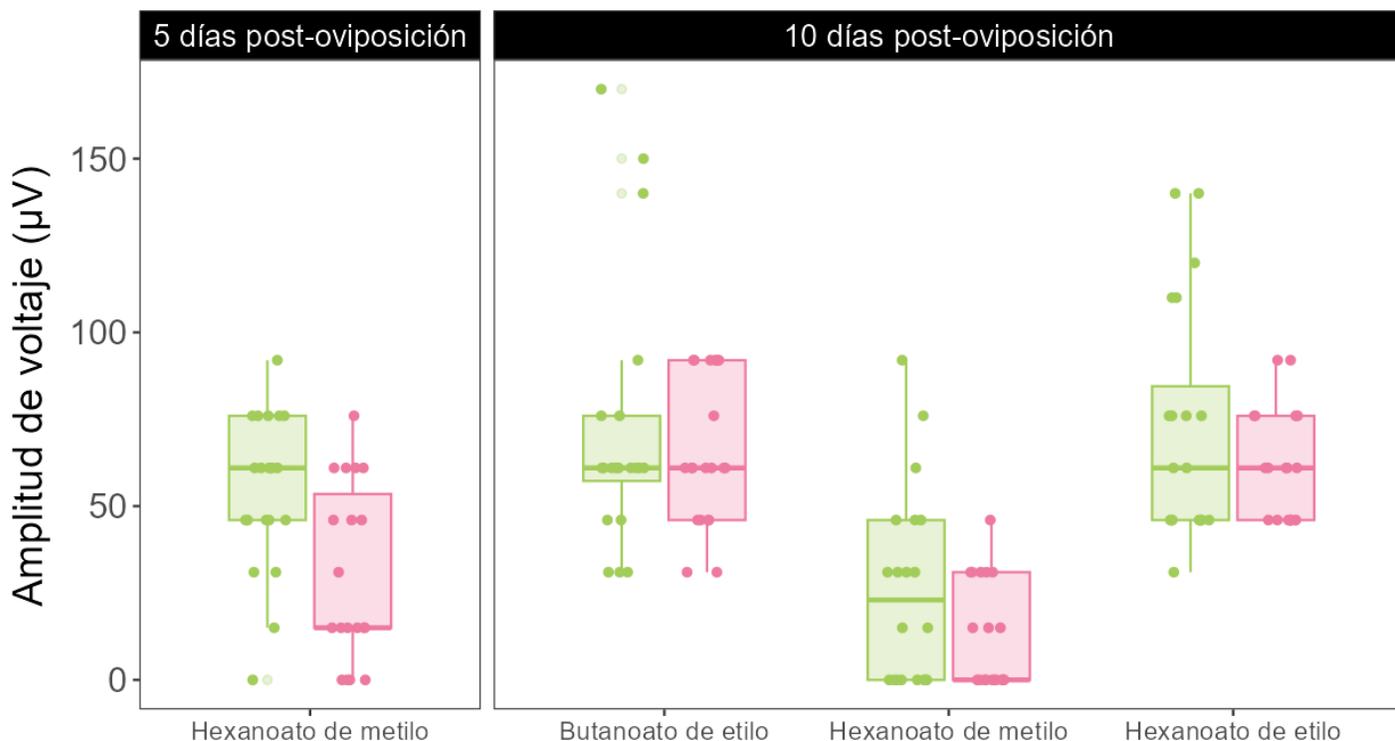


Figura 20. Respuesta electroantenográfica (GC-EAD) de *Leptopilina boulardi* y *Trichopria anastrephae* a frutillas con distinto grado de desarrollo de *Drosophila suzukii*. Detección periférica al día 5 post-infestación (izquierda) y al día 10 post-infestación (derecha) de los parasitoides, *L. boulardi* (verde) y *T. anastrephae* (rojo) (n = 19-21 a cada tiempo para cada especie). Los puntos muestran la distribución de los datos, los *boxplots* el rango intercuartílico (RIC) dividido por la mediana y los bigotes los datos dentro del 1,5x RIC.

II. Calidad del proceso de esterilización de *Drosophila suzukii*

A modo de validación del proceso de irradiación, se registró el porcentaje de emergencia, la proporción de sexos, el grado de esterilidad logrado y la sobrevivencia de los mismos. De forma semejante a lo reportado por Krüger y colaboradores (2018), no se observaron desviaciones en el porcentaje de emergencia (50-80 %) y en la proporción de sexos (1:1) respecto a los controles.

Esterilidad-Fertilidad

Para evaluar el potencial reproductivo de las moscas estériles, se realizaron los siguientes cruzamientos: (1) hembras estériles x machos fértiles, (2) hembras fértiles x machos estériles, (3) hembras estériles x machos estériles, y el cruce control (4) hembras fértiles x machos fértiles. Cada cruce constó de parejas sexuales, con individuos de 3 a 4 días de edad para asegurar su madurez sexual. Estos eran incubados con porciones de medio de cultivo mínimo (1 % agar, 2,5 % sacarosa m/v, y 1 % de solución de nipagín 10 % m/v) como sustrato de oviposición, una mezcla de levadura y agua destilada (50 % m/v) dispensada en algodón, y mantenidas bajo las condiciones habituales de cría. El sustrato de oviposición era revisado a diario hasta alcanzar los 5 días, registrando el número de huevos y la eclosión de larvas a trasluz bajo lupa.

La fertilidad es medida del número de huevos eclosionados respecto al número total de huevos ovipuestos. Entretanto, la fecundidad es el número de huevos ovipuestos en relación al total de huevos ovipuestos por hembras no irradiadas (FAO-IAEA, 2022).

En nuestro caso, las moscas fértiles presentaron ovipuestas de $4,3 \pm 2,9$ (promedio de huevos \pm desvío estándar) ($n = 16$), de los cuales eclosionaban $3,2 \pm 2,1$ (75 % de eclosión). Las hembras fértiles cruzadas con machos estériles (120 o 220 Gy), presentaron oviposiciones de $7,5 \pm 6,5$ ($n = 6$) y $3,0 \pm 1,2$ ($n = 10$), respectivamente. Ninguno de estos huevos completaron su desarrollo, siendo completamente infértiles en ambos casos. Entretanto, las hembras irradiadas (120 o 220 Gy) copuladas con machos fértiles fueron completamente infecundas (no se observaban huevos) (Fig. 21).

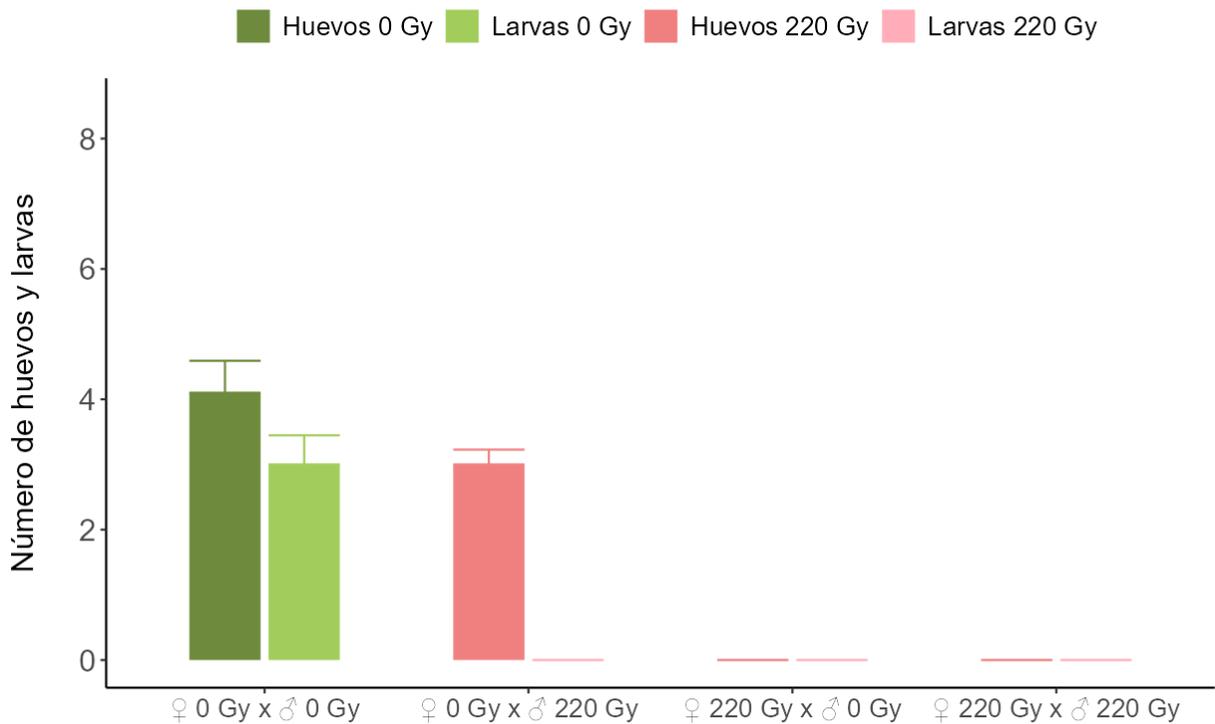
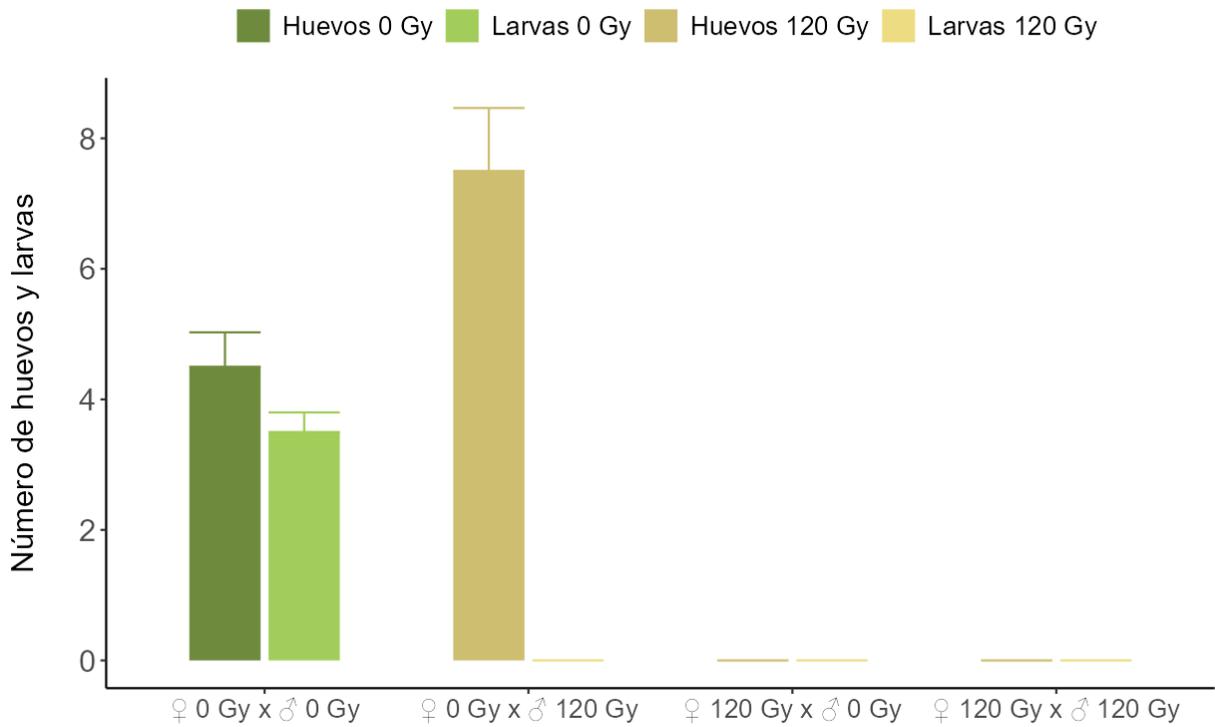


Figura 21. Descendencia de *Drosophila suzukii* irradiadas con 120 y 220 Gy. Los colores diferencian la dosis de radiación, 0 Gy (verde), 120 Gy (amarillo) y 220 Gy (rojo), y las tonalidades corresponden con el estadio observado, huevos (oscuro) y larvas (claro). Los números reportados representan el acumulado de huevos ovipuestos y de eclosiones promedio, resultante del seguimiento de parejas sexuales durante 5 días (n = 6 de cada cruce para el grupo de 120 Gy y n = 10 para los del grupo de 220 Gy). Cada barra presenta su correspondiente error estándar.

En otra oportunidad y aproximación metodológica, en ocasión de evaluar cuán disminuida estaba la capacidad reproductiva en términos de descendencia en estado de pupa, las parejas (5) eran incubadas en medios de cría estándar y eran revisadas 10 días después. Este método fue evaluado con moscas irradiadas con 120 Gy únicamente y no se realizó el cruzamiento de parejas estériles. En los sustratos de las moscas fértiles se encontraban $27,75 \pm 14,33$ (promedio \pm desvío estándar) pupas acumuladas, $0,71 \pm 0,95$ en hembras fértiles copuladas machos irradiados y $0,50 \pm 0,83$ en las hembras irradiadas con machos fértiles (Fig. 22). Cada cruce fue replicado en 4, 7 y 6 ocasiones, respectivamente. La capacidad reproductiva de una hembra fértil cruzada con un macho irradiado a 120 Gy se reduce al 2,5 %.

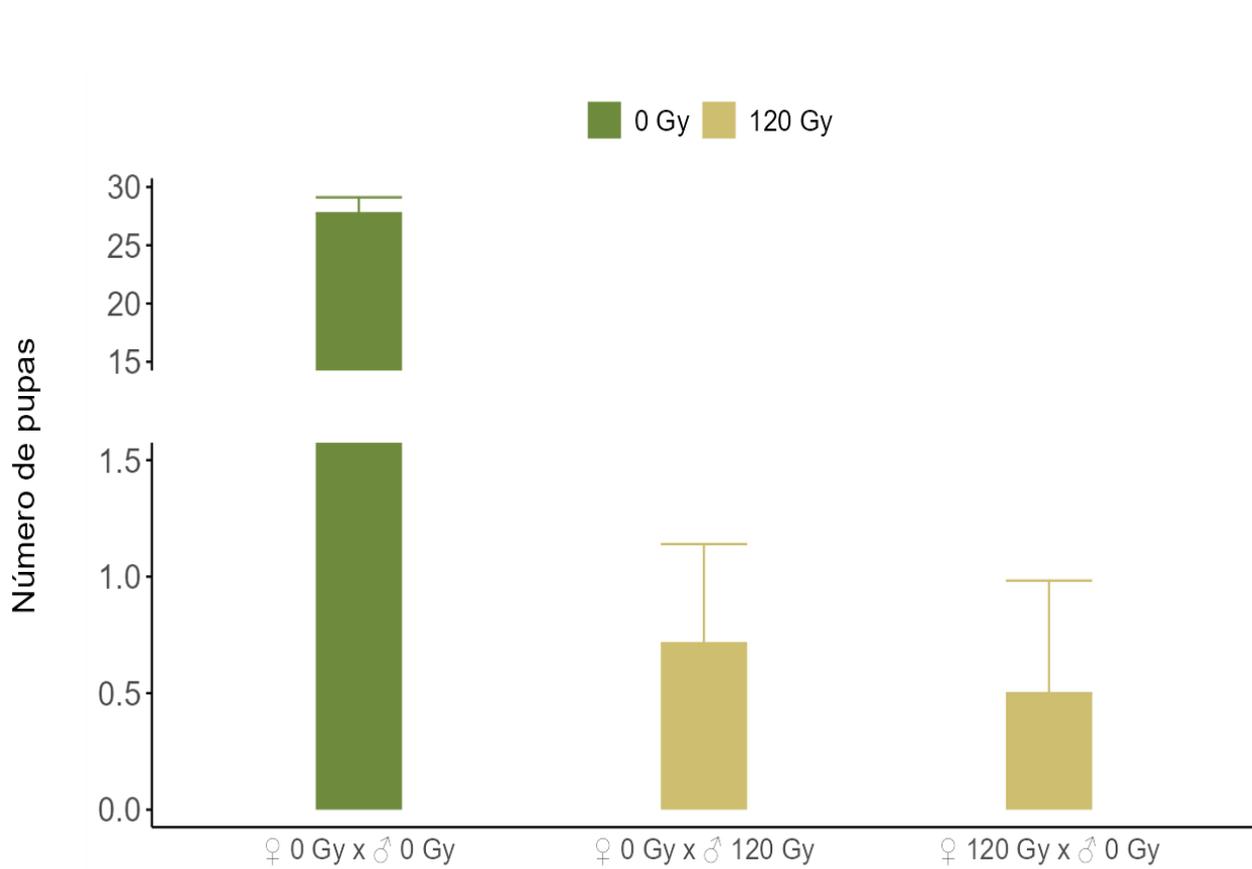


Figura 22. Descendencia de *Drosophila sukii* cuantificada en número de pupas de moscas irradiadas con 120 Gy. Los colores diferencian la dosis de radiación, 0 Gy (verde) y 120 Gy (amarillo). Los números reportados representan el acumulado de pupas promedio correspondiente a la progenie de 5 parejas sexuales a los 10 días de seguimiento (n = 4-7). Cada barra presenta su correspondiente error estándar.

Supervivencia

Una fracción de las moscas trasladadas al CIN de cada tratamiento eran mantenidas en grupos sexados (10-30 individuos) en tubos de cría convencionales con dieta artificial a base de maíz (descrita con anterioridad), y se les realizó un seguimiento periódico registrando los días de vida de cada individuo hasta su término (Fig. 23). Los medios de cría eran recambiados cada 2-3 días.

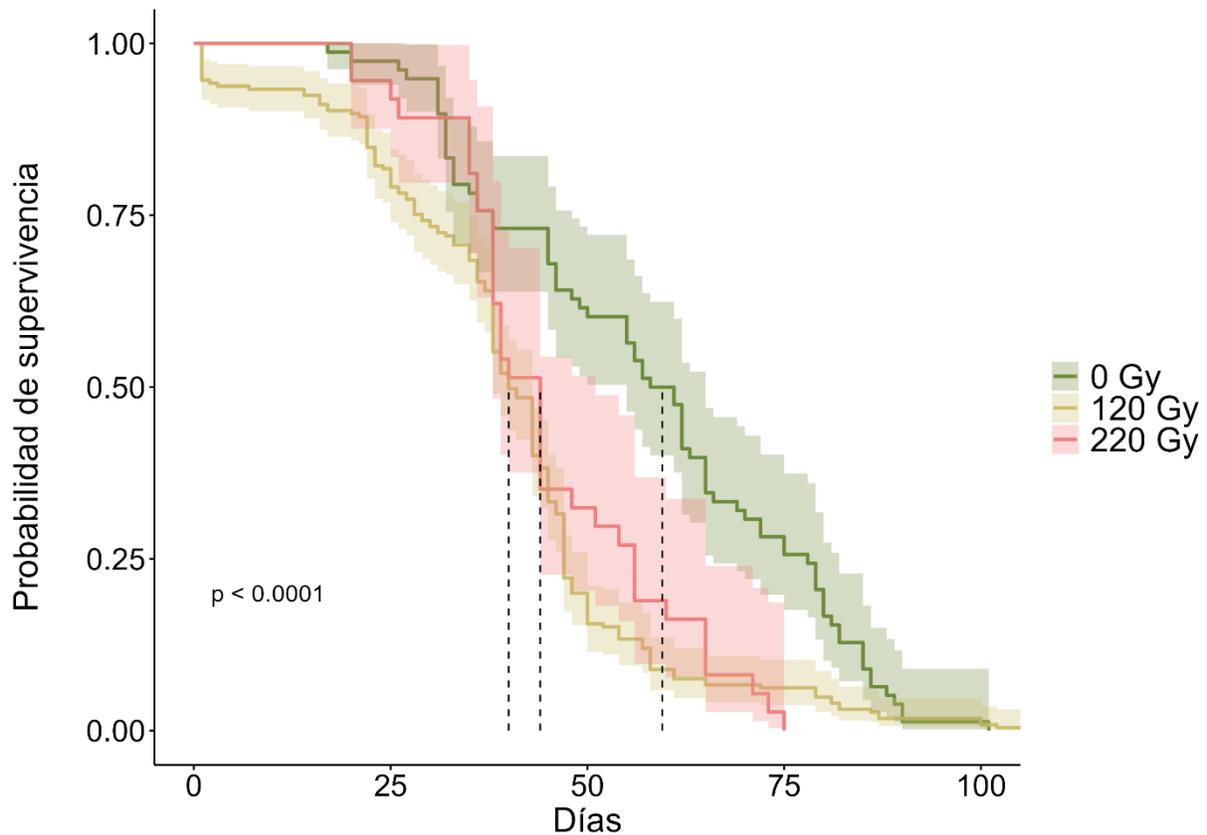


Figura 23. Curvas de supervivencia de machos de *Drosophila suzukii* expuestos a distintas dosis de radiación; 0, 120 y 220 Gy (verde, amarillo y rojo, respectivamente). Las líneas punteadas verticales indican el tiempo cuando la probabilidad de supervivencia se reduce a la mitad. El p-valor correspondiente a la prueba Log-rank indica diferencias entre las curvas de los distintos tratamientos (p -valor = 0,0001).

Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier fueron comparadas mediante el test de Mantel-Cox (Log-rank test) ('*survival*' package para el análisis estadístico y representación gráfica básica, y '*survminer*' package para las gráficas definitivas a través de '*ggplot2*' package).

Los resultados de la sobrevivencia son contrastantes en relación a los reportados en la literatura. Lanouette y colaboradores (2017), reportan una sobrevivencia de 1 a 36 días para los machos, mantenidos con acceso a alimento y agua *ad libitum*, sin evidenciar diferencias entre las dosis hasta los 120 Gy (máxima dosis evaluada por estos autores). Estas diferencias probablemente respondan al modo de manutención de las moscas durante el seguimiento.

En nuestro caso, se observan diferencias en la longevidad alcanzada del grupo expuesto a 220 Gy (75 días), respecto a las moscas expuestas a 120 Gy (108 días) y los controles (101 días). Además, se registraron reducciones en el tiempo de vida media de los grupos irradiados (120 y 220 Gy) en comparación a los controles (0 Gy); 40, 44 y 59,5 días, respectivamente. Sin embargo, la SIT implica liberaciones masivas y periódicas, posiblemente a una mayor frecuencia en relación a los tiempos de vida media observados, siendo aún posibles escenarios de inundación de insectos estériles. En este sentido, al establecer días arbitrarios de corte podemos aproximar cuando se comienzan a diferenciar los tratamientos. Por ejemplo, al día 30 no se observan diferencias entre las curvas de supervivencia (p -valor = 0,96), y sí se comienzan a observar a partir de los 40 días (p -valor = 0,056).

Las diferencias observadas entre los tratamientos de esterilización pueden deberse a las distintas afecciones de las células somáticas a causa de las elevadas dosis de radiación administradas. En estos casos, la reducción de la esperanza de vida se ha asociado a un debilitamiento del tejido epitelial del sistema digestivo (Sakurai et al., 2000). Por el contrario, dosis de radiación bajas pueden tener efectos positivos en la esperanza de vida de los insectos (Calabrese, 2013).

Referencias bibliográficas

- Anderson, M. J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance.
- 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. <https://doi.org/10.1007/s13744-017-0554-7>
- Anton, S., & Jacquín-Joly, E. (2022). Semiochemicals and Insect Control. In *Extended Biocontrol* (pp. 197-204). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Atallah, J., Teixeira, L., Salazar, R., Zaragoza, G., & Kopp, 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: Biological Sciences*, 281(1781), 20132840. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2840>
- Ayer, Jr. R. K., & Carlson, J. (1992). Olfactory physiology in the *Drosophila* antenna and maxillary palp: acj6 distinguishes two classes of odorant pathways. *Journal of neurobiology*, 23(8), 965-982.
- Baena, R., Araujo, E. S., Souza, J. P. A., Bischoff, A. M., Zarbin, P. H. G., Zawadneak, M. A. C., & Cuquel, F. L. (2022). Ripening stages and volatile compounds present in strawberry fruits are involved in the oviposition choice of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *Crop Protection*, 153, 105883. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105883>
- Bakri, A., Heather, N., Hendrichs, J., & Ferris, I. (2005). Fifty Years of Radiation Biology in Entomology: Lessons Learned from IDIDAS. *Annals of the Entomological Society of America*, 98(1), 1-12. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2005\)098\[0001:FYORBI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2005)098[0001:FYORBI]2.0.CO;2)
- Basson, C. E., Groenewald, J.-H., Kossmann, J., Cronjé, C., & Bauer, R. (2010). Sugar and acid-related quality attributes and enzyme activities in strawberry fruits: Invertase is the main sucrose hydrolysing enzyme. *Food Chemistry*, 121(4), 1156-1162. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.064>
- Biondi, A., Wang, X., & Daane, K. M. (2021). Host preference of three Asian larval parasitoids to closely related *Drosophila* species: Implications for biological control of *Drosophila suzukii*. *Journal of Pest Science*, 94(2), 273-283. <https://doi.org/10.1007/s10340-020-01272-0>
- Bohbot, J. D., & Pitts, R. J. (2015). The narrowing olfactory landscape of insect odorant receptors. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 3. <https://doi.org/10.3389/fevo.2015.00039>
- Bolton, L. G., Piñero, J. C., & Barrett, B. A. (2019). Electrophysiological and Behavioral Responses of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) Towards the Leaf Volatile β -cyclocitral and Selected Fruit-Ripening Volatiles. *Environmental Entomology*, 48(5), 1049-1055. <https://doi.org/10.1093/ee/nvz092>
- Boscán de Martínez, N., & Godoy, F. (1996). New parasitoids from *Anastrepha* and *Ceratitis* fruit flies in Venezuela. *Agronomía Tropical (Venezuela)*, 46(4), 465-471.

- Buonocore-Biancheri, M.J., Kirschbaum, D.S., Suárez, L., Ponssa, M.D., Ovruski, S.M. *Drosophila suzukii* in Argentina: State of the art and further perspectives. *Neotrop. Entomol.* 2024, 53, 1–17.
- Brazeiro, A., Bresciano, D., Brugnoli, E., & Iturburu, M. (eds.) (2021). *Especies exóticas invasoras de Uruguay: distribución, impactos socioambientales y estrategias de gestión*. RETEMA-UdelaR, CEEI-Ministerio de Ambiente, Montevideo, 226p.
- Calabrese, E. J. (2013). Low doses of radiation can enhance insect lifespans. *Biogerontology*, 14(4), 365-381.
- Calkins, C. O., & Parker, A. G. (2005). Sterile Insect Quality. In: Dyck, V. A., Hendrichs J., & Robinson A.S. (eds.). *Sterile Insect Technique Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. Springer, 269–296.
- 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.
- Cavey, M., Charroux, B., Travaillard, S., Manière, G., Berthelot-Grosjean, M., Quitard, S., Minervino, C., Detailleur, B., Grosjean, Y., & Prud'homme, B. (2023). Increased sugar valuation contributes to the evolutionary shift in egg-laying behavior of the fruit pest *Drosophila suzukii*. *PLOS Biology*, 21(12), e3002432. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002432>
- Cha, D. H., Adams, T., Rogg, H., & Landolt, P. J. (2012). Identification and Field Evaluation of Fermentation Volatiles from Wine and Vinegar that Mediate Attraction of Spotted Wing *Drosophila*, *Drosophila suzukii*. *Journal of Chemical Ecology*, 38(11), 1419-1431. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0196-5>
- Chiang, A., Priya, R., Ramaswami, M., VijayRaghavan, K., & Rodrigues, V. (2009). Neuronal activity and Wnt signaling act through Gsk3- β to regulate axonal integrity in mature *Drosophila* olfactory sensory neurons. *Development*, 136(8), 1273-1282. <https://doi.org/10.1242/dev.031377>
- 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.
- Cloonan, K. R., Abraham, J., Angeli, S., Syed, Z., & Rodriguez-Saona, C. (2018). Advances in the Chemical Ecology of the Spotted Wing *Drosophila* (*Drosophila suzukii*) and its Applications. *Journal of Chemical Ecology*, 44(10), 922-939. <https://doi.org/10.1007/s10886-018-1000-y>
- Colazza, S., & Wajnberg, E. (2013). Chemical Ecology of Insect Parasitoids: Towards a New Era. En E. Wajnberg & S. Colazza (Eds.), *Chemical Ecology of Insect Parasitoids* (1.^a ed., pp. 1-8). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118409589.ch1>
- Conchou, L., Lucas, P., Meslin, C., Proffit, M., Staudt, M., & Renou, M. (2019). Insect Odorscapes: From Plant Volatiles to Natural Olfactory Scenes. *Frontiers in Physiology*, 10, 972. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00972>
- Crava, C. M., Sassù, F., Tait, G., Becher, P. G., & Anfora, G. (2019). Functional transcriptome analyses of *Drosophila suzukii* antennae reveal mating-dependent olfaction plasticity in females. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 105, 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.12.012>

- 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.
- Das, A., Lee, S.-H., Hyun, T. K., Kim, S.-W., & Kim, J.-Y. (2013). Plant volatiles as method of communication. *Plant Biotechnology Reports*, 7(1), 9-26. <https://doi.org/10.1007/s11816-012-0236-1>
- De Bruyne, M., & Baker, T. C. (2008). Odor Detection in Insects: Volatile Codes. *Journal of Chemical Ecology*, 34(7), 882-897. <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9485-4>
- De Bruyne, M., Foster, K., & Carlson, J. R. (2001). Odor Coding in the *Drosophila* Antenna. *Neuron*, 30(2), 537-552. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00289-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00289-6)
- De Jong, R., & Kaiser, L. (1991). Odor learning by *Leptopilina bouvardi*, a specialist parasitoid (Hymenoptera: Eucoilidae). *Journal of Insect Behavior*, 4(6), 743-750. <https://doi.org/10.1007/BF01052228>
- Dekker, T., Revadi, S., Mansourian, S., Ramasamy, S., Lebreton, S., Becher, P. G., Angeli, S., Rota-Stabelli, O., & Anfora, G. (2015). Loss of *Drosophila* pheromone reverses its role in sexual communication in *Drosophila suzukii*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1804), 20143018. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.3018>
- Diepenbrock, L. M., Swoboda-Bhattarai, K. A., & Burrack, H. J. (2016). Ovipositional preference, fidelity, and fitness of *Drosophila suzukii* in a co-occurring crop and non-crop host system. *Journal of Pest Science*, 89(3), 761-769. <https://doi.org/10.1007/s10340-016-0764-5>
- Dong, J., Zhang, Y., Tang, X., Jin, W., & Han, Z. (2013). Differences in volatile ester composition between *Fragaria × ananassa* and *F. vesca* and implications for strawberry aroma patterns. *Scientia Horticulturae*, 150, 47-53. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.11.001>
- Dukas, R. (2000). Potential fitness consequences of associative learning in a parasitoid wasp. *Behavioral Ecology*, 11(5), 536-543. <https://doi.org/10.1093/beheco/11.5.536>
- Dyck, V. A., Hendrichs, J., & Robinson, A. S. (Eds.). (2005). *Sterile insect technique: Principles and practice in area-wide integrated pest management*. Springer.
- El Degwi, M. S., & Zahran, N. F. (2019). Morphological Effect of Gamma Radiation on the Antennal Sensory Structure of Peach Fruit Fly, *Bactrocera zonata*, Using Electron Microscopy. *Entomological News*, 128(2), 177. <https://doi.org/10.3157/021.128.0205>
- FAO/IAEA. 2022. Guidelines for Mass Rearing and Irradiation of *Drosophila suzukii* for Sterile Insect Technique Application, Guilhot, R., Taret, G., Gembinsky, K., & Cáceres, C. (eds.), Food and Agriculture Organization of the United Nations/International Atomic Energy Agency. Vienna, Austria. 29 pp.
- 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.

- Frederickx, C., Verheggen, F. J., Brostaux, Y., & Haubruge, E. (2014). Associative Learning of *Nasonia vitripennis* Walker (Hymenoptera:Pteromalidae) to Methylsulfanylmethane. *Journal of Forensic Sciences*, 59(2), 413-416. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12348>
- Funes, C. F., Rendon, D., Saez, J. V., Allori Stazonelli, E., Pastor, L. C., Gibilisco, S. M., Bouvet, J. P., Maza, N., & Kirschbaum, D. S. (2024). Evaluation of *Trichopria anastrephae* performance as parasitoid of *Drosophila suzukii* and *Zaprionus indianus*, under controlled laboratory conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 172(6), 472-478. <https://doi.org/10.1111/eea.13436>
- Gandolfi, M., Mattiacci, L., & Dorn, S. (2003). Preimaginal learning determines adult response to chemical stimuli in a parasitic wasp. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1533), 2623-2629. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2541>
- Giorgini, M., Rossi Stacconi, M. V., Pace, R., Tortorici, F., Cascone, P., Formisano, G., Spiezia, G., Fellin, L., Carlin, S., Tavella, L., Anfora, G., & Guerrieri, E. (2024). Foraging behavior of *Ganaspis brasiliensis* in response to temporal dynamics of volatile release by the fruit-*Drosophila suzukii* complex. *Biological Control*, 195, 105562. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2024.105562>
- Giunti, G., Canale, A., Messing, R. H., Donati, E., Stefanini, C., Michaud, J. P., & Benelli, G. (2015). Parasitoid learning: Current knowledge and implications for biological control. *Biological Control*, 90, 208-219. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.06.007>
- González, G., Mary, A. L., & Goñi, B. (2015). *Drosophila suzukii* (Matsumura) found in Uruguay. *Drosoph Inf Serv*, 98, 103-107.
- Gress, B. E., & Zalom, F. G. (2019). Identification and risk assessment of spinosad resistance in a California population of *Drosophila suzukii*. *Pest Management Science*, 75(5), 1270-1276. <https://doi.org/10.1002/ps.5240>
- Gutiérrez-Ibáñez, C., Villagra, C. A., & Niemeyer, H. M. (2007). Pre-pupation behaviour of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* (Haliday) and its consequences for pre-imaginal learning. *Naturwissenschaften*, 94(7), 595-600. <https://doi.org/10.1007/s00114-007-0233-3>
- Hansson, B. S., & Stensmyr, M. C. (2011). Evolution of Insect Olfaction. *Neuron*, 72(5), 698-711. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.003>
- Havaux, M. (2020). β -Cyclocitral and derivatives: Emerging molecular signals serving multiple biological functions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 155, 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.07.032>
- Hazaa, M. A. (2010). Morphological ultrastructure, distribution and function of the antennal sensilla of the cotton leaf worm male moth as affected by gamma radiation and/or heat stress. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 3(4B), 1485-1508.
- Heil, M. (2008). Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist*, 178(1), 41-61.
- Hoballah, M. E. F., Tamo, C., & Turlings, T. C. J. (2002). Differential attractiveness of induced odors emitted by eight maize varieties for the parasitoids *Cotesia marginiventris*: is quality or quantity important? *Journal of Chemical Ecology*.

- Hoedjes, K. M., Kruidhof, H. M., Huigens, M. E., Dicke, M., Vet, L. E. M., & Smid, H. M. (2011). Natural variation in learning rate and memory dynamics in parasitoid wasps: Opportunities for converging ecology and neuroscience. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1707), 889-897. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.2199>
- Homem, R., Mateos-Fierro, Z., Jones, R., Gilbert, D., Mckemey, A., Slade, G., & Fountain, M. (2022). Field Suppression of Spotted Wing Drosophila (SWD) (*Drosophila suzukii* Matsumura) Using the Sterile Insect Technique (SIT). *Insects*, 13(4), 328. <https://doi.org/10.3390/insects13040328>
- Ibrahim, H. A. M., Sawires, S. G., & Hamza, A. F. (2018). Morphological characterization and distribution of antennal sensilla of irradiated female mosquito, *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) with gamma radiation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 11(4), 291-298. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2018.03.005>
- Jeong, S. A., Kim, J., Byun, B. K., Oh, H. W., & Park, K. C. (2020). Morphological and ultrastructural characterization of olfactory sensilla in *Drosophila suzukii*: Scanning and transmission electron microscopy. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 23(4), 1165-1180.
- Kaiser, L., Pérez-Maluf, R., Sandoz, J. C., & Pham-Delègue, M. H. (2003). Dynamics of odour learning in *Leptopilina boulardi*, a hymenopterous parasitoid. *Animal Behaviour*, 66(6), 1077-1084. <https://doi.org/10.1006/anbe.2003.2302>
- Karageorgi, M., Bräcker, L. B., Lebreton, S., Minervino, C., Cavey, M., Siju, K. P., Grunwald Kadow, I. C., Gompel, N., & Prud'homme, B. (2017). Evolution of Multiple Sensory Systems Drives Novel Egg-Laying Behavior in the Fruit Pest *Drosophila suzukii*. *Current Biology*, 27(6), 847-853. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.01.055>
- Keesey, I. W., Knaden, M., & Hansson, B. S. (2015). Olfactory Specialization in *Drosophila suzukii* Supports an Ecological Shift in Host Preference from Rotten to Fresh Fruit. *Journal of Chemical Ecology*, 41(2), 121-128. <https://doi.org/10.1007/s10886-015-0544-3>
- Kerguelen, V., & Cardé, R. T. (1996). Reinforcement mechanisms of olfactory conditioning during parasitization by the parasitoid *Brachymeria intermedia* (Hymenoptera: Chalcididae). *Journal of Insect Behavior*, 9(6), 947-960. <https://doi.org/10.1007/BF02208981>
- Kirkpatrick, D. M., Leach, H. L., Xu, P., Dong, K., Isaacs, R., & Gut, L. J. (2018). Comparative Antennal and Behavioral Responses of Summer and Winter Morph *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) to Ecologically Relevant Volatiles. *Environmental Entomology*, 47(3), 700-706. <https://doi.org/10.1093/ee/nvy046>
- Knipling, E. F. (1955). Possibilities of Insect Control or Eradication Through the Use of Sexually Sterile Males1. *Journal of Economic Entomology*, 48(4), 459-462. <https://doi.org/10.1093/jee/48.4.459>
- Kogan, M. (1998). Integrated Pest Management: Historical Perspectives and Contemporary Developments. *Annual Review of Entomology*, 43(1), 243-270. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.243>
- Krüger, A. P., Garcez, A. M., Scheunemann, T., Nava, D. E., & Garcia, F. R. M. (2023). *Trichopria anastrephae* as a biological control agent of *Drosophila suzukii* in strawberries [Preprint]. In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3146871/v1>

- Krüger, A. P., Schlesener, D. C. H., Martins, L. N., Wollmann, J., Deprá, M., & Garcia, F. R. M. (2018). Effects of Irradiation Dose on Sterility Induction and Quality Parameters of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *Journal of Economic Entomology*, 111(2), 741-746. <https://doi.org/10.1093/jee/tox349>
- Krüger, A. P., Schlesener, D. C. H., Martins, L. N., Wollmann, J., Deprá, M., & Garcia, F. R. M. (2019). Radiation Effects on *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) Reproductive Behaviour. *Journal of Applied Entomology*, 143(1-2), 88-94. <https://doi.org/10.1111/jen.12563>
- Kwadha, C. A., Okwaro, L. A., Kleman, I., Reherrmann, G., Revadi, S., Ndlela, S., Khamis, F. M., Nderitu, P. W., Kasina, M., George, M. K., Kithusi, G. G., Mohamed, S. A., Lattorff, H. M. G., & Becher, P. G. (2021). Detection of the spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii*, in continental sub-Saharan Africa. *Journal of Pest Science*, 94(2), 251-259. <https://doi.org/10.1007/s10340-021-01330-1>
- Lanouette, G., Brodeur, J., Fournier, F., Martel, V., Vreysen, M., Cáceres, C., & Firlej, A. (2017). The Sterile Insect Technique for the Management of the Spotted Wing Drosophila, *Drosophila suzukii*: Establishing the Optimum Irradiation Dose. *PLOS ONE*, 12(9), e0180821. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180821>
- Lauyé, A. L. M. (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).
- Law, J. H. & Regnier, F. E. (1971) *Annu. Rev. Biochem.* 40, 533-548.
- Lee, B., Lin, P., Cha, H. S., Luo, J., & Chen, F. (2016). Characterization of volatile compounds in Cowart muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) during ripening stages using GC-MS combined with principal component analysis. *Food Science and Biotechnology*, 25(5), 1319-1326. <https://doi.org/10.1007/s10068-016-0207-3>
- Lee, J. C., Bruck, D. J., Dreves, A. J., Ioriatti, C., Vogt, H., & Baufeld, P. (2011). In Focus: Spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii*, across perspectives. *Pest Management Science*, 67(11), 1349-1351. <https://doi.org/10.1002/ps.2271>
- 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). *Annals of the Entomological Society of America*, 108(2), 117-129. <https://doi.org/10.1093/aesa/sau014>
- Lee, J. C., Wang, X., Daane, K. M., Hoelmer, K. A., Isaacs, R., Sial, A. A., & Walton, V. M. (2019). Biological Control of Spotted-Wing *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae)—Current and Pending Tactics. *Journal of Integrated Pest Management*, 10(1), 13. <https://doi.org/10.1093/jipm/pmz012>
- Lewis, W. J., & Takasu, K. (1990). Use of learned odours by a parasitic wasp in accordance with host and food needs. *Nature*, 348(6302), 635-636.
- Lewis, W. J., & Tumlinson, J. H. (1988). Host detection by chemically mediated associative learning in a parasitic wasp. *Nature*, 331(6153), 257-259.

- Lima, A. C. (1940). Alguns parasitos de moscas de frutas. *Anais da Academia Brasileira de Ciência*, v.12, n.1, p.17-20.
- Lima, I., Tadeo, E., Remedios-Mendoza, M., Martínez-Hernández, M. D. J., & Ruiz-Montiel, C. (2023). Evidence of a pheromone involved in the behaviour of *Drosophila suzukii* Matsumura (Diptera: Drosophilidae). *Journal of Applied Entomology*, 147(10), 990-1000. <https://doi.org/10.1111/jen.13195>
- Little, C. M., Chapman, T. W., & Hillier, N. K. (2019). Considerations for Insect Learning in Integrated Pest Management. *Journal of Insect Science*, 19(4), 6. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iez064>
- Loreto, F., Dicke, M., Schnitzler, J., & Turlings, T. C. J. (2014). Plant volatiles and the environment. *Plant, Cell & Environment*, 37(8), 1905-1908. <https://doi.org/10.1111/pce.12369>
- Meiners, T. (2003). Associative Learning of Complex Odours in Parasitoid Host Location. *Chemical Senses*, 28(3), 231-236. <https://doi.org/10.1093/chemse/28.3.231>
- Meiners, T. (2015). Chemical ecology and evolution of plant–insect interactions: A multitrophic perspective. *Current Opinion in Insect Science*, 8, 22-28. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.02.003>
- Mostafa, S., Wang, Y., Zeng, W., & Jin, B. (2022). Floral Scents and Fruit Aromas: Functions, Compositions, Biosynthesis, and Regulation. *Frontiers in Plant Science*, 13, 860157. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.860157>
- Nevo, O., Razafimandimby, D., Valenta, K., Jeffrey, J. A. J., Reisdorff, C., Chapman, C. A., Ganzhorn, J. U., & Ayasse, M. (2019). Signal and reward in wild fleshy fruits: Does fruit scent predict nutrient content? *Ecology and Evolution*, 9(18), 10534-10543. <https://doi.org/10.1002/ece3.5573>
- Nevo, O., Valenta, K., Helman, A., Ganzhorn, J. U., & Ayasse, M. (2022). Fruit scent as an honest signal for fruit quality. *BMC Ecology and Evolution*, 22(1), 139. <https://doi.org/10.1186/s12862-022-02064-z>
- 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. <https://doi.org/10.1007/BF00987744>
- Oland, L., Tolbert, L., & Mossman, K. (1988). Radiation-induced reduction of the glial population during development disrupts the formation of olfactory glomeruli in an insect. *The Journal of Neuroscience*, 8(1), 353-367. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-01-00353.1988>
- 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.
- Papaj, D. R., & Vet, L. E. M. (1990). Odor learning and foraging success in the parasitoid, *Leptopilina heterotoma*. *Journal of Chemical Ecology*, 16(11), 3137-3150. <https://doi.org/10.1007/BF00979616>
- Park, Y. C., Shaffer, C. E. H., & Bennett, G. N. (2009). Microbial formation of esters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(1), 13-25. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2170-x>

- Peñaflor, M. F. G. V. (2019). Use of semiochemical-based strategies to enhance biological control. Natural enemies of insect pests in neotropical agroecosystems: Biological control and functional biodiversity, 509-522.
- Piñero, J. C., Barrett, B. A., Bolton, L. G., & Follett, P. A. (2019). β -cyclocitral synergizes the response of adult *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) to fruit juices and isoamyl acetate in a sex-dependent manner. *Scientific Reports*, 9(1), 10574. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47081-z>
- Potting, R. P. J., Otten, H., & Vet, L. E. M. (1997). Absence of odour learning in the stemborer parasitoid *Cotesia flavipes*. *Animal Behaviour*, 53(6), 1211-1223. <https://doi.org/10.1006/anbe.1996.0382>
- Price, P. W., Bouton, C. E., Gross, P., McPheron, 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(1), 41-65. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.11.110180.000353>
- Ramasamy, S., Ometto, L., Crava, C. M., Revadi, S., Kaur, R., Horner, D. S., Pisani, D., Dekker, T., Anfora, G., & Rota-Stabelli, O. (2016). The Evolution of Olfactory Gene Families in *Drosophila* and the Genomic Basis of chemical-Ecological Adaptation in *Drosophila suzukii*. *Genome Biology and Evolution*, 8(8), 2297-2311. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw160>
- R Core Team (2023). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <<https://www.R-project.org/>>.
- Rehermann Del Rio, G. (2022). Fruit and microbial cues in the behavioural ecology and management of *Drosophila suzukii*. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae*, (2022: 32).
- Revadi, S., Vitagliano, S., Rossi Stacconi, M. V., Ramasamy, S., Mansourian, S., Carlin, S., Vrhovsek, U., Becher, P. G., Mazzoni, V., Rota-Stabelli, O., Angeli, S., Dekker, T., & Anfora, G. (2015). Olfactory responses of *Drosophila suzukii* females to host plant volatiles. *Physiological Entomology*, 40(1), 54-64. <https://doi.org/10.1111/phen.12088>
- Robacker, D. C., & Garcia, J. A. (1993). Effects of age, time of day, feeding history, and gamma irradiation on attraction of Mexican fruit flies (Diptera: Tephritidae), to bacterial odor in laboratory experiments. *Environmental Entomology*, 22(6), 1367-1374.
- Robacker, D. C., Garcia, J. A., & Hart, W. G. (1990). Attraction of a laboratory strain of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) to the odor of fermented chapote fruit and to pheromones in laboratory experiments. *Environmental entomology*, 19(2), 403-408.
- Robinson, A. S. (2005). Genetic Basis of the Sterile Insect Technique. In: Dyck, V. A., Hendrichs J., & Robinson A.S. (eds.). *Sterile Insect Technique Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. Springer, 95–114.
- Sakurai, H., Y. Murakami, T. Kohama, and T. Teruya. 2000. Sterilizing mechanism of gammaradiation in the female of West Indian sweet potato weevil, *Euscepes postfasciatus*. *Research Bulletin of the Faculty of Agriculture, Gifu University, Japan, Number 65: 13–20.*

- Satake, A., Hagiwara, T., Nagano, A. J., Yamaguchi, N., Sekimoto, K., Shiojiri, K., & Sudo, K. (2024). Plant Molecular Phenology and Climate Feedbacks Mediated by BVOCs. *Annual Review of Plant Biology*, 75(1), 605-627. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-060223-032108>
- Sato, K., Pellegrino, M., Nakagawa, T., Nakagawa, T., Vosshall, L. B., & Touhara, K. (2008). Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature*, 452(7190), 1002-1006. <https://doi.org/10.1038/nature06850>
- Schweitzer, E. S., Sanes, J. R., & Hildebrand, J. G. (1976). Ontogeny of electroantennogram responses in the moth, *Manduca sexta*. *Journal of Insect Physiology*, 22(7), 955-960. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(76\)90078-0](https://doi.org/10.1016/0022-1910(76)90078-0)
- Siddiqi, O. (1987). Neurogenetics of olfaction in *Drosophila melanogaster*. *Trends in Genetics*, 3, 137-142.
- Stenberg, J. A., Sundh, I., Becher, P. G., Björkman, C., Dubey, M., Egan, P. A., Friberg, H., Gil, J. F., Jensen, D. F., Jonsson, M., Karlsson, M., Khalil, S., Ninkovic, V., Rehmann, G., Vetukuri, R. R., & Viketoft, M. (2021). When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. *Journal of Pest Science*, 94(3), 665-676. <https://doi.org/10.1007/s10340-021-01354-7>
- Stensmyr, M. C., Dekker, T., & Hansson, B. S. (2003). Evolution of the olfactory code in the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1531), 2333-2340. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2512>
- Stocker, R. F. (2001). *Drosophila* as a focus in olfactory research: Mapping of olfactory sensilla by fine structure, odor specificity, odorant receptor expression, and central connectivity. *Microscopy Research and Technique*, 55(5), 284-296. <https://doi.org/10.1002/jemt.1178>
- Symonds, M. R. E., & Wertheim, B. (2005). The mode of evolution of aggregation pheromones in *Drosophila* species. *Journal of Evolutionary Biology*, 18(5), 1253-1263. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2005.00971.x>
- Tait, G., Mermer, S., Stockton, D., Lee, J., Avosani, S., Abrieux, A., Anfora, G., Beers, E., Biondi, A., Burrack, H., Cha, D., Chiu, J. C., Choi, M.-Y., Cloonan, K., Crava, C. M., Daane, K. M., Dalton, D. T., Diepenbrock, L., Fanning, P., ... Walton, V. M. (2021). *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): A Decade of Research Towards a Sustainable Integrated Pest Management Program. *Journal of Economic Entomology*, 114(5), 1950-1974. <https://doi.org/10.1093/jee/toab158>
- Takemoto, H., Kainoh, Y., & Takabayashi, J. (2011). Learning of plant volatiles by aphid parasitoids: Timing to learn. *Journal of Plant Interactions*, 6(2-3), 137-140. <https://doi.org/10.1080/17429145.2010.548607>
- Tatarko, A. R., Leonard, A. S., & Mathew, D. (2023). A neonicotinoid pesticide alters *Drosophila* olfactory processing. *Scientific Reports*, 13(1), 10606. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37589-w>
- Thorpe, W. H., & Jones, F. G. W. (1937). Olfactory conditioning in a parasitic insect and its relation to the problem of host selection. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences*, 124(834), 56-81. <https://doi.org/10.1098/rspb.1937.0072>

- Tochen, S., Dalton, D. T., Wiman, N., Hamm, C., Shearer, P. W., & Walton, V. M. (2014). Temperature-Related Development and Population Parameters for *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) on Cherry and Blueberry. *Environmental Entomology*, 43(2), 501-510. <https://doi.org/10.1603/EN13200>
- Tochen, S., Woltz, J. M., Dalton, D. T., Lee, J. C., Wiman, N. G., & Walton, V. M. (2016). Humidity affects populations of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in blueberry. *Journal of Applied Entomology*, 140(1-2), 47-57. <https://doi.org/10.1111/jen.12247>
- 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: ecology and evolutionary perspectives* (pp. 51-78). Boston, MA: Springer US.
- Urbaneja-Bernat, P., Cloonan, K., Zhang, A., Salazar-Mendoza, P., & Rodriguez-Saona, C. (2021). Fruit volatiles mediate differential attraction of *Drosophila suzukii* to wild and cultivated blueberries. *Journal of Pest Science*, 94(4), 1249-1263. <https://doi.org/10.1007/s10340-021-01332-z>
- 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 Protection*, 54, 126-133. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.08.003>
- Vega, G. D. L., Triñanes, F., & González, A. (2021). Effect of *Drosophila suzukii* on blueberry VOCs: Chemical cues for a pupal parasitoid, *Trichopria anastrephae*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-320923/v1>
- Vet, L. E., & Dicke, M. (1992). Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annual review of entomology*, 37, 141-172.
- Vet, L. E. M., & Groenewold, A. W. (1990). Semiochemicals and learning in parasitoids. *Journal of Chemical Ecology*, 16(11), 3119-3135. <https://doi.org/10.1007/BF00979615>
- Vet, L. E. M., Jong, R. D., Giessen, W. A. V., & Visser, J. H. (1990). A learning-related variation in electroantennogram responses of a parasitic wasp. *Physiological Entomology*, 15(2), 243-247. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1990.tb00512.x>
- Vicente, E., Lado, J., Manzoni, A., Arruabarrena, A., Giambiasi, M., Varela, P., & Giménez, G. (s. f.). *El cultivar de frutilla 'INIA Yrupé' (SGS73.1)*.
- Vieira, J. G. A., Krüger, A. P., Scheuneumann, T., Garcez, A. M., Morais, M. C., Garcia, F. R. M., Nava, D. E., & Bernardi, D. (2020). 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. <https://doi.org/10.1111/jen.12799>
- Vieira, J. G. A., Krüger, A. P., Scheuneumann, T., Morais, M. C., Speriogin, H. J., Garcia, F. R. M., Nava, D. E., & Bernardi, D. (2019). Some Aspects of the Biology of *Trichopria anastrephae* (Hymenoptera: Diapriidae), a Resident Parasitoid Attacking *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in Brazil. *Journal of Economic Entomology*, toz270. <https://doi.org/10.1093/jee/toz270>
- Vinson, S. B. (1976). Host Selection by Insect Parasitoids. *Annual Review of Entomology*, 21(1), 109-133. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.21.010176.000545>

- Vivaldo, G., Masi, E., Taiti, C., Caldarelli, G., & Mancuso, S. (2017). The network of plants volatile organic compounds. *Scientific Reports*, 7(1), 11050. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10975-x>
- Walsh, B. D. (1864). *On Phytophagic Varieties and Phytophagic Species*.
- Walsh, D. B., Bolda, M. P., Goodhue, R. E., Dreves, A. J., Lee, J., 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*, 2(1), G1-G7. <https://doi.org/10.1603/IPM10010>
- Wang, W., Dweck, H. K., Talross, G. J., Zaidi, A., Gendron, J. M., & Carlson, J. R. (2022). Sugar sensation and mechanosensation in the egg-laying preference shift of *Drosophila suzukii*. *eLife*, 11, e81703. <https://doi.org/10.7554/eLife.81703>
- Wang, X., Lee, J. C., Daane, K. M., Buffington, M. L., & Hoelmer, K. A. (2020). *Biological control of Drosophila suzukii*. <https://doi.org/10.1603/ICE.2016.92118>
- Wold, S., Sjöström, M., & Eriksson, L. (2001). PLS-regression: A basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58(2), 109-130. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(01\)00155-1](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00155-1)
- Wolf, S., Boycheva-Woltering, S., Romeis, J., & Collatz, J. (2020). *Trichopria drosophilae* parasitizes *Drosophila suzukii* in seven common non-crop fruits. *Journal of Pest Science*, 93(2), 627-638. <https://doi.org/10.1007/s10340-019-01180-y>
- 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.
- Wong, J. S., Wallingford, A. K., Loeb, G. M., & Lee, J. C. (2018). Physiological status of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) affects their response to attractive odours. *Journal of Applied Entomology*, 142(5), 473-482. <https://doi.org/10.1111/jen.12497>
- Yadav, A. K., Butler, C., Yamamoto, A., Patil, A. A., Lloyd, A. L., & Scott, M. J. (2023). CRISPR/Cas9-based split homing gene drive targeting *doublesex* for population suppression of the global fruit pest *Drosophila suzukii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(25), e2301525120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2301525120>
- Yan, H., Jafari, S., Pask, G., Zhou, X., Reinberg, D., & Desplan, C. (2020). Evolution, developmental expression and function of odorant receptors in insects. *Journal of Experimental Biology*, 223(Suppl_1), jeb208215. <https://doi.org/10.1242/jeb.208215>
- Yan, J., Ban, Z., Lu, H., Li, D., Poverenov, E., Luo, Z., & Li, L. (2018). The aroma volatile repertoire in strawberry fruit: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(12), 4395-4402. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9039>
- Zahran, N., Hamza, A., & Kandil, M. (2023). Comparative study of antennal sensilla in irradiated male and female fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* with gamma radiation.

Zahran, N., Sawires, S., & Hamza, A. (2022). Piercing and sucking mouth parts sensilla of irradiated mosquito, *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) with gamma radiation. *Scientific Reports*, 12(1), 17833. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22348-0>