

Université de Montréal

**La technique des insectes stériles comme méthode de lutte contre la
drosophile à ailes tachetées (*Drosophila suzukii*)**

par

Geneviève Lanouette

Département de Sciences Biologiques

Faculté des Arts et Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des Arts et Sciences

en vue de l'obtention du grade de M. Sc.

en Sciences Biologiques

Juillet 2017

© Geneviève Lanouette, 2017

Résumé

La drosophile à ailes tachetées s'avère être un ravageur exotique particulièrement dommageable pour les cultures de petits fruits puisqu'elle s'attaque aux fruits en murissement. Depuis son invasion des continents américain et européen en 2008, ses populations sont contrôlées majoritairement avec des insecticides chimiques. L'objectif de cette étude était d'explorer le potentiel de la technique des insectes stériles (TIS) comme approche de lutte à la drosophile à ailes tachetées, d'abord en irradiant des pupes à différentes doses pour identifier la dose optimale pour la stérilisation des mâles et, par la suite, en évaluant les capacités reproductives de ces mâles irradiés. En premier lieu, il a été observé que l'irradiation n'avait pas d'effet significatif sur l'émergence, la malformation et la longévité des adultes à chacune des doses testées. Suite à l'accouplement de mâles irradiés avec des femelles saines, deux équations ont été obtenues permettant d'établir une relation entre la dose d'irradiation et un taux d'éclosion des œufs et leur survie jusqu'au stade adulte. Ces résultats ont permis de choisir la dose de 120 Gy comme dose d'irradiation pour la drosophile à ailes tachetées dans un contexte de TIS. Les capacités reproductives des mâles irradiés à cette dose ont ensuite été comparées à celles des mâles non-irradiés. Les mâles irradiés se sont révélés significativement aussi efficaces que les mâles non-irradiés pour accoupler et transmettre du sperme aux femelles en absence de compétition. En conditions de compétition, le succès d'accouplement par le mâle irradié a été de 37,5% et de 62,5% par le mâle non-irradié, mais sans différence significative. Puis, une expérience sur le ré-accouplement des femelles a conclu que celui-ci était peu fréquent et n'était pas influencé significativement par l'irradiation des mâles.

Mots-clés : Espèces envahissantes, gestion des ravageurs, stérilisation, lutte autocide, écologie comportementale, mouche à fruit

Abstract

Spotted wing drosophila is an exotic pest especially damaging to berry crops because of its ability to lay eggs inside ripening fruits. Since its invasion of North America and Europe in 2008, its populations are controlled mainly with chemical insecticides. The objective of this study was to explore the potential of the sterile insect technique (SIT) as a control method for the spotted wing drosophila, first by irradiating pupae at different doses to identify the optimum dose for male sterilization, and secondly by evaluating the reproductive capacities of these irradiated males. First, it was observed that irradiation had no significant effect on emergence, malformation and longevity of adults at any of the doses tested. Following mating of irradiated males with healthy females, two equations were obtained to establish a relation between the irradiation dose and the egg hatch rate, and the survival rate to the adult stage. These results made it possible to choose the dose of 120 Gy as the irradiation dose for the spotted wing drosophila in an SIT context. The reproductive capacities of males irradiated at this dose were later compared with those of non-irradiated males. Irradiated males were shown to be significantly as effective as non-irradiated males to mate and transfer sperm to females in absence of competition. In competitive conditions however, the success of irradiated males was of 37.5% and of 62.5% for the non-irradiated males, but without significant difference. Then, an experiment on the re-mating of the females concluded that it was infrequent and was not significantly influenced by the irradiation of the males.

Keywords : Invasive species, pest management, sterilization, behavioral ecology, fruit fly

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract	ii
Liste des tableaux	vi
Liste des figures	vii
Liste des sigles et abréviations	ix
Remerciements	x
Introduction générale.....	1
Chapitre 1 : La revue de littérature	4
1.1 Introduction de la technique des insectes stériles	4
1.2 Les avantages et inconvénients de la TIS	6
1.2.1 La protection de l'environnement et des marchés	6
1.2.2 L'étude et le suivi de la population cible	7
1.2.3 L'élevage de masse et ses coûts économiques	8
1.2.4 La séparation des mâles et des femelles	9
1.2.5 La compétitivité des mâles	9
1.2.6 Les ratios d'insectes stériles	10
1.2.7 Un effort continu et à grande échelle	11
1.3 Drosophile à ailes tachetées, <i>Drosophila suzukii</i>	12
1.3.1 Biologie et phénologie	12
1.3.2 La reproduction	13
1.3.3 Distribution mondiale	14
1.3.4 Dommages économiques	15
1.3.5 La lutte au ravageur	16
1.4 La compétition spermatique.....	17
Hypothèses et prédictions.....	19
Hypothèse A	19
Hypothèse B	20
Objectifs	21
Chapitre 2 : The sterile insect technique for the management of the spotted wing drosophila, <i>Drosophila suzukii</i> : establishing the optimum irradiation dose	23

Abstract	25
Introduction.....	26
Material and methods	29
Insect colonies and rearing method	29
Irradiation.....	30
Adult emergence and deformed flies	30
Longevity	31
Fecundity.....	32
Fertility	33
F1 survival.....	33
F1 fertility	34
Results	35
Adult emergence and deformed flies	35
Longevity	35
Fecundity.....	35
Fertility	36
F1 survival.....	36
F1 fertility	36
Discussion.....	36
Acknowledgment.....	39
References.....	41
Table.....	48
Figures	49
Chapitre 3 : Mating capacity and competitiveness of <i>Drosophila suzukii</i> males after irradiation treatment and study of female remating	54
Abstract	56
Introduction.....	57
Material and method.....	60
Irradiation.....	60
Mating capacity	60
Competitiveness	61
Female re-mating	63

Results	64
Mating capacity	64
Competitiveness	64
Female re-mating	65
Discussion.....	66
Acknowledgment.....	69
References	69
Figures	74
Conclusion	78
Bibliographie	85

Liste des tableaux

Table 1: Effect of gamma irradiation dose applied to *D. suzukii* males on the fertility of males and females of the F1 generation.....48

Tableau 2 : Les expériences à effectuer lors de l'adaptation de la technique des insectes stériles à une nouvelle espèce81

Liste des figures

Figure 1: Effect of irradiation dose on percent <i>D. suzukii</i> adult emergence and percentage deformed adults	49
Figure 2: Effect of irradiation dose on longevity of <i>D. suzukii</i> (A) males and (B) females when flies had access to food and water	50
Figure 3: Effect of irradiation dose on <i>D. suzukii</i> fecundity (number of eggs oviposited in one week per ten couples) when either males or females were irradiated	51
Figure 4: Effect of irradiation dose on egg hatch when non-irradiated <i>D. suzukii</i> females were mated with irradiated males	52
Figure 5: Effect of irradiation dose on survival to adult stage of eggs laid by non-irradiated <i>D. suzukii</i> females when mated with irradiated males	53
Figure 6: Effect of gamma irradiation at the pupal stage with dose of 120 Gy of males <i>Drosophila suzukii</i> on sperm storage in females' reproductive organs	74
Figure 7: Effect of gamma irradiation at the pupal stage with dose of 120 Gy of males <i>Drosophila suzukii</i> time budget when irradiated males were in competition with non-irradiated males	75

Figure 8: Effect of gamma irradiation at the pupal stage with dose of 120 Gy on *Drosophila suzukii* female re-mating percentage a) if her first mate has been irradiated or non-irradiated b) if the second male presented to her has been irradiated or non-irradiated 76

Figure 9: Effect of gamma irradiation at the pupal stage with dose of 120 Gy of *Drosophila suzukii* males on mating properties a) Latency b) Mating duration..... 77

Liste des sigles et abréviations

CRCHUM : Centre de recherche du centre hospitalier de l'Université de Montréal

Gy : «Gray», unité de mesure de la dose d'irradiation absorbée, correspond à l'énergie ionisante nécessaire pour augmenter d'un joule l'énergie d'un milieu homogène d'une masse d'un kilogramme

IAEA : «*International atomic energy agency*», agence internationale d'énergie atomique

IRDA : Institut de recherche et de développement en agroenvironnement

SIT et TIS : «*Sterile insect technique*», technique des insectes stériles

Remerciements

Je voudrais premièrement remercier ma co-directrice Annabelle Firlej et mon directeur Jacques Brodeur pour les efforts qu'ils ont fournis à chaque étape de la recherche et de la rédaction. Leurs efforts ont contribué à la réalisation de ce projet.

Merci aussi à toutes les personnes consultées à un moment ou l'autre durant ma maîtrise, vos connaissances ont amélioré la qualité de mon travail : François Fournier, Véronique Martel, Marc Vreysen, Carlos Cáceres, Franz Vanoosthuysse, Alessandro Dieni, Michelle Grenier et Guy Boivin.

Un gros merci aux stagiaires qui ont travaillé sur mon projet comme si c'était le leur et qui m'ont permis de réaliser toutes les expériences : Alexa Lutteri, Marianne Gousy-Leblanc et Maxence Jacquot-Atuyer. Merci à tous les gens de l'IRDA de St-Bruno-de-Montarville, qui m'ont accueillie dans la famille pendant mes deux années de maîtrise. Merci aussi à l'IAEA pour la réalisation d'un stage à l'étranger.

Je voudrais remercier mes parents Louis Lanouette et Bernadette Vink de m'avoir soutenu et encouragé pendant cette maîtrise, ainsi que mon frère Benjamin et ma sœur Anne-Marie qui m'ont montré l'exemple de la persévérance. Je tiens aussi à remercier María Laura Juárez pour ne m'avoir jamais laissé abandonner mes rêves.

Cette étude a été réalisée grâce au support financier du Programme Innov'action agroalimentaire de l'accord Cultivons l'Avenir 2 conclu entre le Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec et Agriculture et Agroalimentaire Canada. Le stage à Vienne a été financé grâce à la Bourse de courts séjours d'études universitaires à l'extérieur du Québec du Ministère de l'Éducation et de l'Enseignement supérieur.

Introduction générale

De nos jours, les invasions par des espèces exotiques sont communes et se produisent à des fréquences de plus en plus élevées (Hulme 2009). La hausse du commerce international (Williamson 1996) et les changements climatiques (Dukes et al. 2009) contribuent majoritairement à ce phénomène. Williamson (1996) estime que de toutes les espèces introduites, seulement 1% rencontrent les conditions climatiques et écologiques nécessaires pour s'établir, devenir envahissantes et causer des pertes de revenu ou menacer la santé humaine (Suckling et al. 2013). Entre autres, les espèces envahissantes sont totalement ou partiellement responsables d'environ 50% des extinctions d'espèces d'oiseaux (Stattersfield et al. 2000) et de poissons (Miller et al. 1989).

Les espèces envahissantes peuvent causer des dommages importants dans plusieurs domaines. Par exemple, des insectes ravageurs ou des maladies exotiques peuvent mettre en péril l'agriculture d'une région. Conventionnellement, on traite ces ravageurs avec l'utilisation de pesticides chimiques. Cependant, ceux-ci peuvent entraîner plusieurs conséquences négatives, comme l'évolution de ravageurs résistants, des risques pour la santé humaine, une diminution des populations d'insectes bénéfiques (pollinisateurs, prédateurs, parasitoïdes), une contamination de l'environnement et une baisse de la biodiversité (Pimentel et Lehman 1993, Stenersen 2004, Devine et Furlong 2007). Il existe des méthodes plus saines que l'utilisation unique de pesticides pour la lutte aux organismes nuisibles envahissants (Smith et al. 1976). Parmi celles-ci, la lutte intégrée est une démarche combinant diverses méthodes biologiques, chimiques, mécaniques, culturales ou génétiques pour contrôler efficacement la population d'un ravageur en dessous d'un seuil dommageable, tout en se souciant à la fois de l'environnement et de la rentabilité des récoltes (Stern et al. 1959, Geier 1966). Par exemple,

des techniques mécaniques comme le désherbage et la destruction des plants contaminés, des techniques culturales comme la rotation des cultures et l'utilisation de plantes résistantes, modifiées génétiquement ou non, puis des techniques biologiques comme l'application de bactéries, de virus, de champignons pathogènes, de prédateurs, de parasitoïdes ou de phéromones peuvent être combinées pour obtenir une régie de culture intégrée (Knipling 1992, Copping et Menn 2000).

En lutte intégrée, il existe deux méthodes qui utilisent la perturbation de la reproduction pour contrôler les populations d'un organisme nuisible. La première, la confusion sexuelle, consiste à saturer un environnement de phéromones sexuelles femelles à l'aide d'un diffuseur, afin d'empêcher les mâles de trouver les femelles et de les accoupler (Carde 1990). La deuxième méthode, la technique d'insectes stériles (TIS) ou lutte autocide, consiste à lâcher des mâles stériles de la même espèce dans l'environnement afin qu'ils se reproduisent avec des femelles sauvages et les rendent ainsi non-fécondes (Klassen et Curtis 2005). La TIS est utilisée à travers le monde pour le contrôle des mouches à fruits (Kakinohana et al. 1993, Pereira et al. 2013), du moustique-tigre (Oliva et al. 2012), du carpocapse de la pomme (Vreysen et al. 2010), d'aleurodes (Calvitti et al. 2000), du charançon de la pomme de terre (Moriya et Miyatake 2001) et, au Québec, de la mouche de l'oignon et de la mouche du chou (Fournier et Brodeur 2007, 2009, 2012).

Un tout nouveau ravageur de petits fruits, la drosophile à ailes tachetées (*Drosophila suzukii*) a envahi les continents américain et européen depuis 2008 (Bolda et al. 2010, Hauser 2011). Contrairement aux autres espèces de drosophiles, celle-ci possède un ovipositeur acéré qui lui permet de pondre des œufs dans les fruits en mûrissement (Walsh et al. 2011). Les larves se développent dans les fruits, provoquant leur affaissement, et la perte totale de leur valeur

commerciale (Cini et al. 2012). L'industrie des petits fruits subit donc une augmentation des coûts de production, pour les traitements insecticides mais aussi pour l'augmentation de la main d'œuvre nécessaire, en plus d'une baisse de production (Farnsworth et al. 2016).

L'objectif de cette étude est d'adapter la TIS à la lutte à la drosophile à ailes tachetées, afin de réduire la dépendance aux pesticides chimiques face à cette espèce. Pour ce faire, il faut trouver en premier lieu la dose d'irradiation gamma nécessaire à la stérilisation des mâles en laboratoire et vérifier que cette irradiation n'affecte pas la valeur adaptative des insectes, par exemple en réduisant leur émergence, leur longévité ou en provoquant des malformations. Ensuite, il faut s'assurer que les mâles stériles produits en laboratoire sont compétitifs face aux mâles sains. Lors de l'utilisation de la TIS, les mâles irradiés lâchés en nature doivent trouver les femelles et faire concurrence aux mâles sauvages pour l'accouplement des femelles. Ce sont donc les caractéristiques comportementales des mâles qui seront étudiés dans la deuxième partie du mémoire afin de déterminer si les mâles stériles produits sont compétitifs.

Chapitre 1 : La revue de littérature

1.1 Introduction de la technique des insectes stériles

La technique des insectes stériles (TIS) est une méthode de lutte autocide, ce qui signifie qu'elle force l'espèce à se nuire à elle-même. Cela est possible en stérilisant des mâles de l'espèce, et en les répandant dans la zone à traiter. Les mâles stériles chercheront les femelles sauvages et les accoupleront, ce qui résultera en une ponte d'œufs non-fertiles, et une diminution de la descendance. Suite à des lâchers d'insectes stériles sur plusieurs générations, une population d'insectes nuisibles peut être réduite sous un seuil acceptable, voire éradiquée (Klassen et Curtis 2005). Les espèces visées sont principalement des ravageurs de cultures, des vecteurs de maladies humaines ou animales ou des espèces envahissantes.

La technique a été mise au point dans les années 1950 par les entomologistes américains Dr Edward F. Knipling et Dr Raymond C. Bushland avec la lucilie bouchère *Cochliomyia hominivorax* Coquerel (Diptera : Calliphoridae). Un premier succès a mené à son éradication de l'île de Curaçao et son contrôle progressif à travers l'Amérique (The World Food Prize 1992, Wyss et Tan 2000). Suite à cette réussite, la technique a été utilisée pour d'autres insectes nuisibles, notamment la mouche méditerranéenne des fruits *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera : Tephritidae) (Hendrichs et al. 2002). L'usine d'El Pino au Guatemala produit présentement 800 millions de mâles stériles par semaine de ce ravageur de nombreux fruits, dont les agrumes, les pêches et les mangues, ce qui permet d'envisager son éradication de nombreux pays d'Amérique centrale (Programa Moscamed Guatemala 2016). Depuis 1994, la TIS est utilisée en Colombie-Britannique contre le carpocapse de la pomme *Cydia pomonella* Linnaeus (Lepidoptera: Tortricidae) (Bloem et al. 2007). Elle a permis d'obtenir un pourcentage de pommiers non-attaqués variant entre 81 et 95% tout en réduisant significativement la quantité d'insecticides utilisés (Bloem et al. 2007). Une étude de coûts/bénéfices a conclu que la

technique était rentable lorsqu'utilisée sur une grande surface (Cartier 2015). Au Québec, la TIS est aussi disponible commercialement en Montérégie depuis 2011 pour la lutte à la mouche de l'oignon *Delia antiqua* Meigen (Diptera : Anthomyiidae) grâce à un programme de recherche débuté en 2004 par le Prisme Consortium. La compagnie possède une usine capable de produire 30 millions de mouches par été, augmente son aire de distribution à d'autres régions du Québec et continue les recherches pour adapter la TIS à la mouche du chou *Delia radicum* Linnaeus (Diptera : Anthomyiidae) (Prisme Consortium 2016).

Chez les insectes holométaboles, la stérilisation en laboratoire se fait vers la fin du stade pupal ou dès l'émergence des adultes. Le stade pupal apporte cependant l'avantage de faciliter les manipulations, le stockage et l'exportation des insectes stériles (Bakri et al. 2005). La stérilisation des individus mâles et femelles se fait par rayonnements ionisants, principalement des rayons gammas ou des rayons X, puisqu'ils ont une forte énergie et un pouvoir de pénétration très élevé (Parker et Mehta 2007, Helinski et al. 2009). L'irradiation des insectes entraîne une mutation par bris de chromosomes qui cause la mort de l'embryon en développement, suite à la fécondation d'un ovule sain par un spermatozoïde portant la mutation (Robinson 2005). Une des premières étapes d'établissement d'une TIS consiste à l'identification de la dose idéale d'irradiation des insectes qui les stérilise mais préserve leurs qualités physiques et comportementales. La stérilité doit être maintenue durant toute la vie adulte des individus; Lüning (1952) ayant remarqué chez *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera, Drosophilidae) que des individus irradiés à trop faibles doses retrouvaient partiellement leur fertilité avec le temps, jusqu'à un effet négligeable du traitement après 20 jours.

Puisque l'intensité de l'irradiation nécessaire pour parvenir à une stérilité prolongée de 100% peut réduire fortement la compétitivité des mâles, il peut s'avérer plus efficace d'utiliser une dose plus faible d'irradiation pour produire des mâles capables d'accoupler plus de femelles (Bakri et al. 2005, Robinson et Hendrichs 2005). Par exemple, Toledo et al. (2004) ont observé que des mâles *Anastrepha obliqua* Macquart (Diptera : Tephritidae) irradiés à 40 gy avec une stérilité moyenne de 99,5% étaient deux fois plus efficaces pour augmenter la quantité d'œufs stériles pondus sur le terrain que des mâles irradiés à 80 gy avec une stérilité complète. Une stérilité partielle peut contribuer au contrôle d'une population déjà établie, mais ne représente pas une option lorsque les lâchers constituent une mesure de prévention ou d'éradication, puisqu'il y a un risque d'introduire ou de réintroduire l'espèce (Toledo et al. 2004). La TIS présente divers avantages et désavantages discutés dans les sections suivantes.

1.2 Les avantages et inconvénients de la TIS

1.2.1 La protection de l'environnement et des marchés

Un avantage majeur de la TIS concerne la réduction partielle ou totale de l'utilisation de pesticides chimiques et l'absence de répercussions indésirables sur les espèces non ciblées, comme les ennemis naturels et les pollinisateurs. La TIS permet aussi le contrôle des moustiques vecteurs de maladie en milieu urbain où l'épandage d'insecticides chimiques est mal perçu par la population (Klassen 2005). Elle permet de plus le commerce des fruits produits dans les pays où la réglementation sur les pesticides résiduels est très sévère (Hendrichs et al. 1995), ce qui procure un bénéfice économique aux producteurs. De plus, la création d'une zone exempte d'un certain ravageur favorise l'exportation des produits agricoles sans limites de marché (Klassen 2005).

1.2.2 L'étude et le suivi de la population cible

Préalablement à l'implantation d'une TIS, il est nécessaire de bien connaître la biologie de l'espèce cible, négliger cet aspect pourrait mener à l'échec d'un programme. Il faut connaître les caractéristiques de la biologie reproductive de l'espèce afin de produire des mâles stériles qui auront la capacité de s'accoupler avec les femelles sauvages (Lance et McInnis 2005). Par exemple, pour le carpocapse de la pomme *Cydia pomonella* Linnaeus (Lepidoptera: Tortricidae), un programme de TIS avait été mis en place avant de savoir que le rythme circadien d'accouplement (i.e. l'heure de l'accouplement) varie selon les conditions environnementales d'élevage, et s'apercevoir que les insectes stériles produits ne s'accouplaient qu'à faible taux avec les individus sauvages. L'élevage de cette espèce en laboratoire doit donc se faire à des températures semblables à celles extérieures pour maximiser l'efficacité de la TIS (Batiste et al. 1973, Judd et al. 2006).

Connaître la capacité de dispersion d'une espèce permet d'estimer l'étendue de la zone tampon que l'on doit traiter autour du verger afin de contrôler efficacement l'insecte cible dans le verger (Lance et McInnis 2005). Une dispersion sur longue distance d'une espèce peut mettre en péril l'efficacité d'une TIS puisque des femelles accouplées avec des mâles sains s'ajouteraient continuellement à la population cible (Prout 1978). Il peut alors être nécessaire de lâcher continuellement des mâles stériles en périphérie des zones traitées pour former une barrière contre la dispersion d'individus fertiles. C'est le cas pour *C. hominivorax* dont des mâles stériles sont lâchés en permanence au Panama pour prévenir sa réintroduction depuis l'Amérique du Sud (Lance et McInnis 2005). De plus, dans le cas des herbivores nuisibles, connaître les plantes hôtes de l'espèce permet de repérer les «points chauds» où celui-ci se trouve et où il faut concentrer les efforts (Lance et McInnis 2005). En général, une espèce avec une plus grande diversité de plantes hôtes sera plus difficile à contrôler, puisque sa distribution sera plus large à

travers le paysage (Mazzi et Dorn 2012). Il est aussi important d'étudier non seulement l'espèce générale, mais aussi la population visée, que ce soit pour connaître sa taille, et donc déterminer la quantité d'insectes stériles à lâcher (Hendrichs et al. 2005).

1.2.3 L'élevage de masse et ses coûts économiques

Pour qu'une TIS fonctionne de manière rentable, l'élevage en masse des insectes et leur stérilisation doivent être simples et possibles à faibles coûts (Vreysen 1995). Ceci représente un avantage pour une espèce à multiplication rapide mais un désavantage pour une espèce qui ne s'élève pas sur une diète artificielle ou univoltine et caractérisée par une diapause obligatoire, qui s'avèrerait trop coûteuse à élever. En fait, l'incapacité de produire de grandes quantités de mâles stériles et compétitifs à faible coût représente le premier facteur d'échec d'une TIS (Knipling 1992).

La main d'œuvre et la diète des insectes demeurent les deux plus grandes dépenses liées à l'élevage de masse d'insectes (Parker 2005). Si l'on réduit les coûts de production par une diminution de la quantité ou de la qualité de la diète offerte aux insectes, on réduit leur qualité et efficacité dans la TIS (Teal et al. 2007, Weldon et Taylor 2011). Comme l'élevage se fait en laboratoire et sur plusieurs générations, il faut aussi faire attention à la sélection artificielle et à une séparation entre la population de laboratoire et la population sauvage (Boller 1972, Ito et Yamamura 2005). L'élevage continu en laboratoire sans rafraîchissement des gènes par introduction de nouveaux individus peut engendrer des différences comportementales entre les populations sauvages et la population en laboratoire. Chez la mouche du melon *Bactrocera cucurbitae* Coquillett (Diptera : Tephritidae), Miyatake (2006) a démontré que les individus produits en laboratoire se développent généralement plus rapidement, se dispersent sur des distances plus courtes en champ et se reproduisent plus hâtivement que les individus sauvages.

1.2.4 La séparation des mâles et des femelles

Dans bien des cas, il est recommandé d'isoler les mâles des femelles lors de l'élevage afin de ne lâcher que des mâles stériles (Hendrichs et al. 1995). L'élimination des femelles en cours de développement peut se faire avec l'introduction d'un gène létal spécifique aux femelles, qui provoque la mort de tous les œufs femelles (Franz et Robinson 2011). Il est aussi parfois possible de séparer les sexes sur la base d'une différence de taille ou de date d'émergence (Parker 2005). Bien que certains considèrent le lâcher des femelles stériles comme un avantage puisqu'elles s'accouplent avec des mâles sauvages, elles peuvent réduire l'efficacité d'un programme sur plusieurs aspects.

En effet, les femelles stériles des ravageurs de fruits comme *C. capitata* peuvent endommager les récoltes en perçant les fruits même si elles ne pondent pas d'œuf (Hendrichs et al. 1995). Pour les insectes vecteurs de maladie (ex. moustiques vecteurs de la malaria) il est impératif de ne pas lâcher de femelles puisque celles-ci propagent la maladie (Parker 2005). Les lâchers de mâles et de femelles stériles peuvent aussi poser problème lorsqu'ils s'accouplent entre eux au site de lâcher (Knipling 1992).

Lorsqu'il est impossible de séparer les mâles et les femelles, le lâcher des femelles peut être acceptable dans la mesure d'une stérilisation complète. Cela ne pose pas de problème puisque les femelles sont habituellement plus sensibles aux rayons ionisants que les mâles, et deviennent stériles à de plus faibles doses (Economopoulos 1977, Arthur et al. 2002).

1.2.5 La compétitivité des mâles

Le succès d'une TIS repose sur l'accouplement entre les femelles sauvages et les mâles irradiés, et celui-ci diminue lorsque les mâles stériles sont de mauvaise qualité (Pérez-Staples et al.

2013). L'irradiation entraîne des dommages aux cellules somatiques en processus de mitose lors du traitement (Helinski et al. 2009). Les malformations qui peuvent s'ensuivre sont physiques comme une réduction du taux d'émergence, de la capacité de vol ou de la longévité des individus ou comportementales vis-à-vis de la reproduction. Celles-ci ont un impact négatif majeur particulièrement chez les espèces où les mâles doivent exécuter un rituel complexe de cour (Pérez-Staples et al. 2013). Par exemple, chez *C. capitata* les mâles irradiés ont un taux d'accouplement 40% plus faible que les mâles non irradiés, car ils passent plus de temps au repos, sont moins motivés à rechercher des femelles et prennent plus de temps entre la rencontre de la femelle et l'accouplement (Lux et al. 2002).

Afin de réduire les dommages causés par l'irradiation, il faut cibler la période la plus propice à celle-ci durant le développement de l'insecte, afin de minimiser la proportion relative de cellules en mitose qui seront potentiellement endommagées. En général, plus les pupes sont âgées lors de la stérilisation, moins elles subissent de pertes physiques et comportementales (Amoako-Atta et Partida 1976, Helinski et al. 2009). De plus, les individus stérilisés au stade adulte chez deux espèces de moustiques vecteurs de malaria *Anopheles stephensi* Liston et *A. gambiae* Giles (Diptera : Culicidae) se sont révélés beaucoup plus compétitifs que les individus stérilisés au stade pupa (Andreasen et Curtis 2005).

1.2.6 Les ratios d'insectes stériles

Plusieurs modèles populationnels ont été développés afin d'estimer l'efficacité d'une TIS. Les paramètres les plus importants sont le taux de croissance moyen de la population sauvage, soit le nombre moyen de descendants femelles produits par chaque femelle adulte, et le ratio mâles stériles : mâles fertiles atteint lors des lâchers (Knipling 1992). L'augmentation du ratio mâles

stériles : mâles fertiles favorise d'autant la probabilité qu'une femelle sauvage s'accouple avec un mâle irradié et ne produise pas de descendance.

Un ratio compensatoire permet de maintenir stable une population. Par exemple, pour contrer une augmentation naturelle de 5x, il faut un ratio 4 : 1 (Klassen 2005); une femelle sur cinq s'accouplera avec un mâle fertile, mais celle-ci produira cinq descendants femelles. Afin de réduire la population ou la mener à son éradication, il faut utiliser un ratio plus élevé que le ratio compensatoire. La TIS fonctionne de mieux en mieux avec la baisse de densité de la population sauvage. Puisque les quantités d'insectes stériles à produire seraient phénoménales lorsque la taille de la population sauvage est grande, une première mesure de contrôle afin de réduire la densité initiale de l'insecte ravageur peut être nécessaire. Ainsi, afin de parvenir à l'éradication de la mouche tsé-tsé *Glossina palpalis palpalis* Robineau-Desvoidy (Diptera: Glossinidae) au Nigéria, d'autres méthodes de lutte préalables comme des pièges et des attractifs imbibés d'insecticides ont été indispensables. La population de mouches a ainsi pu être réduite à 10% de sa densité initiale avant l'implantation d'une TIS, permettant l'atteinte d'un ratio 10 : 1 avec les lâchers de mâles stériles (Takken et al. 1986).

1.2.7 Un effort continu et à grande échelle

Un dernier inconvénient de la TIS consiste à ce que son exécution soit faite de manière continue et à grande échelle. Un arrêt des lâchers d'insectes stériles signifie le retour de la population initiale en quelques générations. Contrairement à l'utilisation de parasitoïdes qui peuvent se reproduire par eux-mêmes en nature suite au premier lâcher, les insectes stériles doivent être continuellement produits en laboratoire et lâchés à chaque génération, ce qui peut désavantager cette technique (Knippling 1992). De plus, une section non-traitée (e.g. un producteur qui refuse de se joindre à l'effort de ses voisins) agit comme un réservoir de l'insecte

nuisible (Ogaugwu 2014), rendant ainsi le programme moins efficace. Par exemple, certains producteurs utilisent la TIS contre *Delia antiqua* Meigen (Diptera : Anthomyiidae) aux Pays-Bas depuis 1981, sans parvenir à éradiquer l'espèce, car la méthode est utilisée seulement sporadiquement à travers le pays dans des zones atteignant au maximum 6 hectares sur un total de 2600 hectares (Loosjes et Tan 2000).

1.3 Drosophile à ailes tachetées, *Drosophila suzukii*

1.3.1 Biologie et phénologie

La drosophile à ailes tachetées *Drosophila suzukii* Matsumura (Diptera : Drosophilidae), un insecte mesurant de 2 à 4 mm une fois adulte, possède trois stades larvaires (Walsh et al. 2011) et a une durée de vie moyenne de 86 jours jusqu'à un maximum de 150 jours à 22°C (Emiljanowicz 2014). Les adultes mâles se distinguent par une tache noire près de l'extrémité de leurs ailes qui commence à apparaître dix heures après l'émergence et prend deux jours pour atteindre sa pigmentation la plus intense (Walsh et al. 2011). Un gros ovipositeur muni de deux «scies» noires et tranchantes de la femelle fait de *D. suzukii* l'une des deux seules espèces de drosophiles (sur 1500), avec *Drosophila pulchrella* Tan (Diptera : Drosophilidae), capables de s'attaquer aux fruits en murissement (Walsh et al. 2011). Les fruits peuvent potentiellement être attaqués dès qu'ils commencent leur murissement et leur changement de couleur (Lee et al. 2011). L'ovipositeur transperce la plupart des fruits à peau mince en laissant une blessure de ponte (Walsh et al. 2011). De un à trois œufs sont déposés par site de ponte, la fécondité potentielle d'une femelle étant de plus de 600 oeufs (Emiljanowicz 2014). Les larves se développent à l'intérieur du fruit dont elles se nourrissent, donnant après quelques jours l'impression que le fruit se serait affaissé ou aurait fondu (Walsh et al. 2011).

En hémisphère nord, *D. suzukii* colonise les cultures du début juillet jusqu'au mois d'octobre où on retrouve plus particulièrement des adultes sexuellement immatures, ce qui suppose une diapause hivernale (Mitsui et al. 2010). Puisqu'elle ne supporte pas les températures sous zéro (Kimura 2004), il n'est pas encore clair si elle trouve un abri pour passer l'hiver dans les régions plus nordiques ou si elle migre vers le Nord chaque année au printemps (Dalton et al. 2011). À l'est des États-Unis et au Canada, *D. suzukii* compte de 3 à 9 générations par été selon le climat (Walsh et al. 2011). Elle peut s'attaquer à de multiples cultures de petits fruits et de fruits à noyaux comme les framboises, les bleuets, les mûres, les fraises, les raisins, les abricots, les cerises, les figues, les nectarines, les poires, les prunes et les pêches. On retrouve aussi parmi ses hôtes des plantes ornementales comme les rosiers et des plantes indigènes comme les cornouillers, la symphorine et la pomme sauvage parmi tant d'autres (Walsh et al. 2011).

1.3.2 La reproduction

Le comportement de cour de *D. suzukii* a été décrit par Revadi et al. (2015) de la manière suivante : le mâle s'oriente vers la femelle, ouvre et ferme ses ailes et vibre son abdomen pour produire les «toots». Les «toots» sont des vibrations perçues via le substrat, mais qui ne sont pas produites par des mouvements des ailes comme le sont les chants (Mazzoni et al. 2013). Le mâle touche la femelle avec une patte antérieure, déploie ses ailes et tourne autour de la femelle ou poursuit la femelle, puis le mâle se déplace vers l'arrière de la femelle et essaie de la monter. L'accouplement a une durée moyenne de 26 minutes chez *D. suzukii* (Revadi et al. 2015).

L'étude de Fuyama (1979) a démontré que comme plusieurs autres espèces de drosophiles avec dimorphisme sexuel, *D. suzukii* utilise un stimulus visuel pour le choix de partenaire. La parade nuptiale de *D. suzukii* comprend le déploiement des ailes du mâle devant la femelle courtisée

pour montrer les taches sur ses ailes (Tomaru et Yamada 2011). Ainsi, les mâles dont les taches noires sur les ailes ont été enlevées chirurgicalement ont un plus faible taux de copulation (Fuyama 1979).

La probabilité qu'une femelle drosophile accepte un deuxième accouplement dépend de la quantité de sperme qui lui a été transféré, de la durée de son premier accouplement et varie selon l'espèce (Hurtado et Hasson 2013). Chez *D. suzukii*, Fuyama (1979) a remarqué que les femelles refusaient une seconde copulation dans la semaine suivant la première, alors que Revadi et al. (2015) a observé un comportement d'accouplement multiple chez les femelles. Un degré élevé d'accouplements multiples suggère un faible niveau de compétition entre les mâles pour l'accès aux femelles, mais plus de compétition au niveau des spermatozoïdes (Markow 1996).

1.3.3 Distribution mondiale

Endémique de l'Asie du Sud-Est, *D. suzukii* a été observée pour la première fois au Japon en 1916, causant alors des dommages aux cultures de cerises (Walsh et al. 2011). *Drosophila suzukii* est une espèce invasive qui a été introduite par le commerce international en Europe et en Amérique du Nord (Hauser 2011, Cini et al. 2012). Suite à une invasive bénigne à Hawaï en 1980 (Kaneshiro 1983), les premiers spécimens sur le continent américain ont été récoltés en 2008 dans des cultures de fraises, framboises et mûres de Californie (Bolda et al. 2010), pour n'être identifiée qu'en 2009 (Hauser 2011). *Drosophila suzukii* a aussi fait son entrée au Canada en 2009 en Colombie-Britannique et au Québec à l'été 2010 (Agence canadienne d'inspection des aliments 2011). Depuis 2013, *D. suzukii* est aussi présente en Amérique du Sud (Deprá et al. 2014). L'Afrique et l'Australie ne sont pas encore envahies (Cini et al. 2012).

Une analyse moléculaire de 12 populations de *D. suzukii* réparties internationalement a démontré que l'introduction de cette espèce s'est faite de manière indépendante en Europe et en Amérique. De plus, les résultats ont soulevé l'hypothèse d'invasions répétitives sur le continent américain, ce qui complique le contrôle ou l'éradication de l'espèce (Adrion et al. 2014). On estime que la propagation naturelle de *D. suzukii* est lente, mais que son expansion rapide en Amérique serait due au commerce de fruits contenant des spécimens infestés (Agence canadienne d'inspection des aliments 2011). Au Québec, *D. suzukii* est très répandue depuis 2012 et détectée par le réseau d'avertissement phytosanitaire du MAPAQ à partir du mois de juillet. Elle cause particulièrement des pertes à l'industrie québécoise du bleuet en corymbe et de la framboise d'automne (Agri-réseau 2013).

1.3.4 Dommages économiques

Bien que l'étendue des dommages aux récoltes demeure difficile à prévoir, l'Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (EPPO) a qualifié *D. suzukii* de menace pour la plupart des pays de son organisation (Cini et al. 2012). En 2009, les dommages aux récoltes variaient de négligeables à 80% de perte selon le lieu et la culture (Bolda et al. 2010). Non seulement *D. suzukii* pond ses œufs dans des fruits à valeur commerciale, mais la blessure de ponte favorise l'accès à d'autres pathogènes comme des champignons filamenteux, des levures et des bactéries (Cini et al. 2012). Une autre espèce envahissante de drosophile, *Zaprionus indianus* Gupta (Diptera : Drosophilidae), qui ne s'attaque habituellement pas aux fruits en développement, peut pondre dans ces fruits en utilisant la cicatrice laissée par *D. suzukii* (Renkema et al. 2013). D'autres coûts doivent être considérés : dépistage, traitements insecticides, augmentation de la main d'œuvre et diminution du marché d'exportation afin de ne pas favoriser la dispersion de l'insecte (Goodhue et al. 2011). Par exemple, le Mexique, l'Australie et la Nouvelle-Zélande ont interdit l'importation de petits fruits provenant de pays

infestés par *D. suzukii* (Agence canadienne d'inspection des aliments 2011). Puisque des programmes de lutte chimique ont été développés dans les dernières années, les producteurs conventionnels de petits fruits peuvent maintenant s'en sortir sans pertes de revenus majeures. Cependant, les producteurs biologiques continuent de subir d'énormes pertes causées par *D. suzukii* puisqu'ils disposent de moins de ressources de lutte (Farnsworth et al. 2016).

1.3.5 La lutte au ravageur

Présentement, le contrôle de *D. suzukii* dans les champs se fait avec des insecticides à large spectre contenant de la cyperméthrine, du malathion ou de l'acétamipride. Bruck et al. (2011) a aussi démontré que les pyrethroïdes, organophosphates et spinosynes étaient efficaces contre *D. suzukii*, alors que les néonicotinoïdes l'étaient peu. Au Québec, les application de produits Exirel, Ripcord, Entrust SC, Delegate WG et Malathion 85 E sont recommandés suite au dépistage d'un individu *D. suzukii* et seul le biopesticide Entrust SC est disponible en certification biologique (Lambert et al. 2014). Cependant, puisque *D. suzukii* a un temps de génération rapide et que seuls les adultes sont susceptibles, les larves et les pupes étant protégées dans le fruit, il est nécessaire de faire plusieurs applications de pesticides, ce qui ne fait qu'augmenter leurs coûts et leurs conséquences négatives pour l'environnement (Cini et al. 2012). Les autres mesures recommandées pour diminuer l'ampleur des dégâts sont le piégeage des adultes, la collecte et la destruction des fruits tombés sur le sol, l'élimination des plantes hôtes alternatives à proximité des champs cultivés, les récoltes rapprochées, l'aération des plants et la pose de filets avec des mailles de 0,98 mm par-dessus les plants (Kawase et al. 2008, Walsh et al. 2011, Cormier et al. 2015).

Les options biologiques contre *D. suzukii* reposent sur l'utilisation d'ennemis naturels, dont *Pachycrepoideus vindemmiae* Rondani (Hymenoptera : Pteromalidae), un ectoparasitoïde des

pupes observé en Oregon et en Colombie-Britannique sur *D. suzukii* qui a réduit à 11% le taux d'émergence des adultes en expérience de laboratoire (Brown et al. 2011). Le prédateur disponible commercialement *Dalotia (Atheta) coriaria* (Kraatz) (Coleoptera: Staphylinidae) a consommé jusqu'à 26 larves de *D. suzukii* préalablement sorties des fruits par jour (Renkema et al. 2015), mais n'a pas réduit significativement la survie de celles croissant dans un fruit (Woltz et al. 2015). Des nématodes et champignons pathogènes ont été testés pour lutter contre *D. suzukii*. L'espèce la plus intéressante pour le moment est *Metarhizium brunneum* Petch (Hypocreales : Metarhizium) parce qu'elle réduit la longévité des adultes et la fécondité des femelles, cependant plus de recherches sont nécessaires avant son utilisation commerciale (Cuthbertson et al. 2014, Cossentine et al. 2016). Toutes ces méthodes demeurent donc expérimentales pour le moment.

La lutte contre *D. suzukii* pose problème aux producteurs de petits fruits puisque seules les applications de pesticides présentent une efficacité satisfaisante (Beers et al. 2011) et parce que la résistance à ces produits pourrait se développer. Des lâchers de mâles stériles pourraient s'intégrer aux efforts actuels afin de contrôler efficacement et à long terme *D. suzukii* de manière respectueuse de l'environnement et sans poser de risque à la santé humaine.

1.4 La compétition spermatique

La compétition spermatique est considérée comme une composante de la sélection sexuelle qui opère après le choix du partenaire (Birkhead et Møller 1998). Lorsque les femelles d'une espèce ont la possibilité de s'accoupler de nouveau avant d'avoir utilisé la totalité des spermatozoïdes du premier mâle, deux types de stratégies peuvent survenir (Parker 1970). Le premier type inclut toutes les stratégies en faveur du premier mâle, par exemple lorsque celui-ci transfère à la

femelle une substance dans le but de réduire les probabilités de ré-accouplement (Smith 2012). Par exemple, un peptide isolé chez *D. melanogaster* produit par les glandes accessoires du mâle et transféré à la femelle lors de l'accouplement réduit la réceptivité de la femelle à un deuxième accouplement (Wolfner 1997). Une femelle accepte un deuxième accouplement lorsqu'elle a épuisé la majorité du sperme du premier mâle (Markow 1996). Alors que le deuxième type de stratégie, en faveur du deuxième mâle, favorise l'utilisation du sperme du deuxième mâle aux dépens de celui du premier mâle (Markow 1996, Smith 2012). Par exemple, il a été démontré chez *Drosophila ananassae* Doleschall (Diptera, Drosophilidae) que le deuxième mâle se débarrasse du sperme du premier mâle lors de l'accouplement, afin de pouvoir féconder la majorité des œufs pondus par la suite (Singh et Singh 2001). Ce retrait de sperme est accompli par les fluides des glandes accessoires transmis à la femelle en même temps que le sperme (Gilchrist et Partridge 1995).

En général chez les insectes, la viabilité des spermatozoïdes est supérieure chez les espèces où les femelles s'accouplent avec plusieurs mâles, suggérant que cette viabilité améliore la compétitivité du sperme (Hunter et Birkhead 2002). Plus précisément chez *D. melanogaster*, le succès de fécondation d'un mâle en situation de compétition spermatique dépend de la quantité et de la qualité du sperme, soit la longueur moyenne des spermatozoïdes, et non du fait qu'il ait été le premier ou le deuxième mâle à s'accoupler avec une femelle (Pattarini et al. 2006). Dans le contexte de la lutte autocide, il importe de déterminer si la stérilité d'un mâle induite par irradiation influence ou non la compétitivité de son sperme lors de la fertilisation (Parker 1970). Par exemple, chez *Anastrepha fraterculus* Wiedemann (Diptera : Tephritidae), la stérilité des mâles lors du premier accouplement n'était pas un facteur influençant la décision de s'accoupler de nouveau chez les femelles (Abraham et al. 2013).

Hypothèses et prédictions

Hypothèse A

Sachant que la survie, les malformations morphologiques et la longévité de diverses espèces de diptères et de lépidoptères varient selon l'âge à laquelle les pupes sont irradiées – les dommages étant plus importants chez les jeunes pupes (Proverbs et Newton 1962, Amoako-Atta et Partida 1976, Kaspi et Parrella 2003, Lance et McInnis 2005, Helinski et al. 2009);

Sachant que les mâles irradiés continuent à produire du sperme et à le transférer aux femelles et que ces dernières n'ont pas la capacité de différencier le sperme viable du sperme non-viable (Robinson 2005);

Sachant qu'en général, les femelles sont plus sensibles à l'irradiation que les mâles (Ameresekere et Georghiou 1971, Cogburn et al. 1973, Brower 1975, Allinghi et al. 2007);

Sachant qu'une dose de 80 gy appliquée à des pupes *D. suzukii* à l'intérieur de fruits les empêche de produire une descendance lorsqu'accouplés entre eux-mêmes (Follett et al. 2014);

Sachant que le stade pupal de *D. suzukii* dure $5,3 \pm 0,4$ jours dans les conditions d'élevage actuelles (expériences préliminaires effectuées à $23 \pm 1^\circ\text{C}$, $50 \pm 10\%$ HR, et sous une photopériode de 16:8 L:O) et $5,8 \pm 0,05$ jours dans la littérature ($22 \pm 0,5^\circ\text{C}$, approx. 25% HR, et photopériode de 15 :9 L :O) (Emiljanowicz 2014);

Nous posons l'**hypothèse A** qu'une irradiation de 70 gy des pupes *D. suzukii* âgées de quatre jours induit une stérilité presque complète des mâles mais n'affecte pas la mortalité à l'émergence, le taux de malformations et la longévité des adultes.

Prédictions

- 1- Les taux de mortalité à l'émergence, de malformation et la longévité des adultes mâles et femelles *D. suzukii* ne seront pas affectés significativement par l'irradiation à la dose stérilisant mâles et femelles.
- 2- La fécondité des femelles *D. suzukii* non-irradiées ne diffèrera pas selon qu'elles soient accouplées à un mâle témoin ou à un mâle irradié, peu importe la dose.
- 3- La stérilité des mâles et des femelles *D. suzukii* augmente avec la dose d'irradiation, et que la dose de 70 gy appliquée à des pupes âgées de quatre jours induira la stérilité optimale.
- 4- Les femelles *D. suzukii* sont plus sensibles à l'irradiation que les mâles : la dose d'irradiation nécessaire pour stériliser les femelles est donc plus faible que celle nécessaire pour stériliser les mâles.

Hypothèse B

Sachant que la stérilisation diminue la valeur adaptative des mâles (Robinson 2005);

Sachant que les femelles *D. suzukii* utilisent un stimulus visuel important à l'acceptation du mâle (taches sur les ailes des mâles) lors de l'accouplement (Fuyama 1979) et non un processus complexe de cour pour choisir leur partenaire (Revadi et al. 2015);

Sachant que chez d'autres mouches à fruits (ex :*Anastrepha fraterculus* Wiedemann (Diptera: Tephritidae)), la stérilité des mâles lors du premier accouplement n'est pas un facteur influençant la décision de s'accoupler de nouveau chez les femelles (Abraham et al. 2013);

Nous posons l'**hypothèse B** que les mâles *D. suzukii* irradiés au quatrième jour de leur développement pupal à la dose optimale seront aussi compétitifs que les mâles témoins.

Prédictions

- 5- Les capacités d'accouplement des mâles *D. sukii* irradiés en situation sans compétition sont similaires à celles des mâles témoins.
- 6- Les capacités d'accouplement en situation de compétition des mâles *D. sukii* irradiés sont similaires à celles des mâles témoins.
- 7- Le statut du mâle lors d'un premier accouplement, témoin vs irradié, n'influence pas la probabilité qu'une femelle s'accouple de nouveau.

Objectifs

Les deux principaux objectifs de cette étude sont de déterminer la dose d'irradiation optimale de stérilisation de *D. sukii* et d'analyser en laboratoire la compétitivité des mâles irradiés. La dose optimale s'avère un compromis entre la stérilité presque complète des individus tout en minimisant les dommages aux autres capacités. Plus précisément, nous avons irradié avec des rayons gammas des pupes de *D. sukii* à huit doses différentes, puis évalué l'émergence des adultes, leur malformation et leur longévité. Nous avons accouplé les individus irradiés à des individus sains du sexe opposé afin de déterminer leur fécondité (nombre d'œufs pondus), leur fertilité (taux d'éclosion des œufs), ainsi que le taux de survie (d'œuf à adulte) et la fertilité de leur descendance. Le but consistait à comparer les résultats pour les huit doses testées et choisir celle proposant le meilleur compromis entre la stérilité et l'absence d'effets négatifs provoqués par l'irradiation. Par la suite, nous avons étudié les capacités d'accouplement des mâles irradiés par rapport à celles des mâles non-irradiés. Une expérience a testé la quantité de femelles qu'un mâle peut accoupler en 24 h, une deuxième expérience a identifié le mâle gagnant en conditions compétitives (un mâle sain et un mâle irradié pour une seule femelle). Puis une dernière expérience a eu pour but d'observer si les femelles acceptent un second accouplement, et si ce

choix est influencé par l'irradiation de son premier partenaire. Ceci signifierait que les femelles peuvent percevoir la stérilité du mâle.

Cette étude constitue une première phase d'un programme de recherche qui vise à examiner le potentiel de la TIS pour le contrôle des populations de *D. sukii*. La dose choisie doit stériliser complètement les femelles, car un lâcher de femelles fertiles contribuerait à augmenter la population des ravageurs à la prochaine génération. La dose doit être un compromis entre la stérilité complète des mâles et l'absence de répercussions négatives aux individus (baisse de l'émergence et de la longévité, malformation). La dose ne doit pas modifier les capacités reproductrices des mâles, avec ou sans compétition. Puis, l'irradiation des mâles ne doit pas influencer leurs partenaires femelles à se ré-accoupler plus rapidement.

**Chapitre 2 : The sterile insect technique for the management of the
spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii*: establishing the
optimum irradiation dose**

Geneviève Lanouette, Jacques Brodeur, François Fournier, Véronique Martel, Marc Vreysen,
Carlos Cáceres and Annabelle Firlej

Accepté à *Plos One*

The sterile insect technique for the management of the spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii*: establishing the optimum irradiation dose

Short title: Optimum irradiation dose for *Drosophila suzukii*

Geneviève Lanouette¹, Jacques Brodeur², François Fournier³, Véronique Martel⁴, Marc Vreysen⁵, Carlos Cáceres⁵ and Annabelle Firlej¹

¹Institut de recherche et de développement en agroenvironnement, Saint-Bruno-de-Montarville (Québec), Canada J3V 0G7

²Institut de recherche en biologie végétale, Université de Montréal, Montréal (Québec), Canada H1X 2B2

³Collège Montmorency, Laval (Québec), Canada H7N 5H9

⁴Centre de foresterie des Laurentides, Ressources naturelles Canada, Québec (Québec), Canada G1V 4C7

⁵Insect Pest Control Laboratory, Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Friedenstrasse 1, A-2444 Seibersdorf, Austria

Abstract

The spotted wing drosophila *Drosophila suzukii* Matsumura (Diptera: Drosophilidae), a pest of berries stone fruits, invaded North America and Europe in 2008. Current control methods rely mainly on insecticides. The sterile insect technique (SIT) has potential as an additional control tactic for the integrated management of *D. suzukii*. As a step towards the development of the SIT, this study aimed at finding the optimum irradiation dose to sterilize *D. suzukii* under controlled laboratory conditions. Four-day-old *D. suzukii* pupae were irradiated 12 to 24 hours prior to adult emergence in a ^{60}Co Gamma Cell 220 and in a ^{137}Cs Gamma Cell 3000 with doses of 30, 50, 70, 80, 90, 100 or 120 Gy. Emergence rate (88.1%), percent of deformed flies (4.0%) and survival curves were not affected by the tested irradiation doses. However, some reproductive parameters of the flies were affected by irradiation. Females irradiated with a dose of 50 Gy or more had almost no fecundity. When non-irradiated females were mated with irradiated males, egg hatch decreased exponentially with irradiation dose from 82.6% for the untreated control males to 4.0% for males irradiated with 120 Gy. Mortality of F1 individuals from the irradiated treatment also occurred during larval and pupal stages, with an egg to adult survival of 0.2%. However, descendants produced by the irradiated generation were fertile. These results are an encouraging first experimental step towards the development of the SIT for the management of *D. suzukii* populations, although further investigation must be undertaken to confirm the irradiation dose based on potential effects on the behavior and competitiveness of irradiated males.

Keywords: Integrated pest management, SIT, invasive species, fertility, fecundity, sterile male quality

Introduction

Drosophila suzukii Matsumura (Diptera: Drosophilidae) is an invasive pest of berries and stone fruits. It is a native from Southeast Asia and was first reported in North America (California) and Europe (Spain) in 2008 (Bolda et al. 2010, Hauser 2011). By 2010, the fly was present in nine states in the USA and four Canadian provinces (Hauser 2011) and in 2013 had reached South America (Deprá et al. 2014). Unlike other *Drosophila* species that thrive on decaying fruits, *D. suzukii* has a serrated ovipositor that allows females to lay eggs in ripening and marketable fruits (Walsh et al. 2011). Not only will the developing larvae damage the fruit, but the puncture made by the ovipositor is an entry point for pathogenic fungi and bacteria (Cini et al. 2012). Initially a pest of cherries in Asia, *D. suzukii* has expanded its host range to more than 15 commercial plant species including raspberries, blueberries, strawberries and grapes within invaded regions where severe damaged are observed (Walsh et al. 2011). Between 2009 and 2014, California alone experienced revenue losses of \$36.4 million and \$3.4 million in conventional and organic production, respectively (Farnsworth et al. 2016). To protect crops from *D. suzukii* infestation, growers mostly have been using chemical insecticides (Beers et al. 2011, Bruck et al. 2011, Van Timmeren and Isaacs 2013, Smirle et al. 2017), requiring an average of four to six applications per growing season (Farnsworth 2014, Farnsworth et al. 2016). Insecticide use leads to environmental pollution, public health issues, pest resistance and mortality of natural enemies (Pimentel 2009). Alternative methods are urgently needed to reduce our dependence on insecticides for the sustainable management of *D. suzukii*.

Alternative methods to insecticides, effective or under evaluation, include mass-trapping of adult flies using attractants (Cha et al. 2012, Landolt et al. 2012), protecting crops with exclusion nets (Cormier et al. 2015), cultivating crops inside closed tunnels (Rogers et al. 2016), spraying crops with natural repellents (Jang et al. 2016, Renkema et al. 2016), harvesting more frequently

(Walsh et al. 2011) and postharvest refrigeration, fumigation or irradiation (Walse et al. 2012, Follett et al. 2014, Tochen et al. 2014). Other avenues include the use of native and/or exotic parasitoids (Chabert et al. 2012, Daane et al. 2016, Guerrieri et al. 2016), generalist predators (Cuthbertson et al. 2014) or entomopathogenic fungi (Cossentine et al. 2016). One alternative approach that remains unexplored is the sterile insect technique (SIT).

The SIT consists of mass-rearing the insect pest in specialized facilities, exposing pupae or adults to ionizing radiation to induce reproductive sterility and releasing them in the target area. The released sterile males will mate with virgin wild females and, as a result, the females will lay unfertile eggs. A sustained release of sterile males in a target area aims at reducing the pest population over time below an acceptable economic threshold, or even reaching local eradication in certain ecological settings (Klassen 2005). The sterilization of males and females is achieved by ionizing radiation, mainly using gamma or X rays which have high levels of energy and penetration power (Parker and Mehta 2007, Helinski et al. 2009). The irradiation triggers lethal mutations in the sperm and, following insemination of the oocyte, the death of the developing embryo (Robinson 2005).

The SIT has been used effectively against many crop and livestock pests and disease vectors. Following the successful eradication of the New World screwworm *Cochliomyia hominivorax* Coquerel (Diptera : Calliphoridae) from the USA, Mexico, Central America and Panama (Wyss 2000), the technique has been increasingly used worldwide for the management of several Tephritidae fruit flies, tsetse flies and Lepidoptera (Klassen and Curtis 2005). Its success depends on the knowledge of the pest biology, the competitiveness of the irradiated males and the sustained and area-wide release of sterile insects (Knipling 1992, Vreysen et al. 2007).

A crucial and initial step in the development of an SIT program is to determine the optimal irradiation dose for the targeted pest species. The optimal dose should sterilize individuals without impairing critical traits of their biology such as their ability to mate. Males exposed to high irradiation doses are potentially less likely to compete and mate with wild females than non-irradiated males. A dose inducing 100% sterility is rarely used as it usually incurs excessive somatic damage to the insects (Bakri et al. 2005, Robinson 2005). For example, Toledo et al. (2004) found that an irradiation dose of 40 Gy induced an average of 99.5% sterility in male *Anastrepha obliqua* Macquart (Diptera: Tephritidae) and that these irradiated males were twice as effective in increasing the amount of sterile eggs in the population than fully sterile males irradiated with 80 Gy. For an optimal use of the SIT, irradiation should cause high sterility without affecting emergence rate, rate of deformed males, adult longevity, and the fecundity of healthy females mated with irradiated males.

The biological quality of irradiated males is assessed using various parameters, e.g. percentage adult emergence, percentage deformed insects, flight ability, longevity with or without access to food, fecundity of inseminated females (number of eggs produced), fertility (percentage of hatching), presence or absence of sperm transfer, male mating competitiveness, and overall capacity to reduce pest populations under semi-field or field conditions (Amoako-Atta and Partida 1976, Kaspi and Parrella 2003, Helinski et al. 2006, Allinghi et al. 2007, Oliva et al. 2012).

This study is part of a large research program that aims to determine the feasibility of using the SIT as an additional control tactic for the integrated pest management of *D. suzukii* populations in fruit crops. The present objective is to quantify the effects of different gamma irradiation doses applied to *D. suzukii* pupae on several biological attributes of irradiated individuals and

their descendant (emergence, deformed males, longevity, fecundity, fertility of parent and descendant flies).

Material and methods

Insect colonies and rearing method

A *D. suzukii* colony was established from individuals collected in a vineyard near San Michele all Adige, Trentino, Italy. The colony had been in culture for one year before being sent to the Insect Pest Control Laboratory (IPCL) of the Joint Food and Agriculture Organization of the United Nation (FAO)/International Atomic Energy Agency (IAEA) Division of the Nuclear Techniques in Food and Agriculture in Seibersdorf, Austria. A first set of laboratory experiments (fertility and fecundity tests) were carried out at the IPCL and the colony was thereafter sent to the Institut de Recherche et de Développement en Agroenvironnement (IRDA), St-Bruno-de-Montarville, Canada, where a second set of experiments was carried out (fecundity, emergence, deformity, longevity, F1's survival and F1's fertility tests). The colony was kept at $23 \pm 1^\circ\text{C}$, $50 \pm 10\%$ HR, and under a 16:8 L:D photoperiod. Two types of larval diet were used: a carrot powder and brewer's yeast diet developed for the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) that is slightly liquid (Mitchell et al. 1965) and a fresh banana, brewer's yeast, flour and sugar diet developed for *D. suzukii* that uses agar to give it more consistency (Chabert et al. 2012). The carrot diet was used to produce large and uniformly sized pupae to be irradiated and for fecundity tests. The banana diet was used for the fertility, F1 survival and F1 fertility experiments because it provides higher egg to pupa survival (22.1% in carrot diet vs. 72.1% in banana diet) (G. Lanouette, unpublished data). When used as oviposition site, the carrot diet was spread inside a 1L rectangular container, covered with thin slices of fresh banana and put inside a rearing cage for 2 to 3 days to attract adult females. Thereafter, the diet was removed from the cage, covered with a mesh and placed under rearing conditions for larval

development. Pupal extraction was done on days 6, 7 and 8 after oviposition using soft clips. Pupae were briefly washed in water and deposited on a wet makeup cotton pad. Following emergence, adults had access to water and a diet composed of white sugar and brewer's yeast (3:1). Adults were reared in 29 X 29 X 29 cm plexiglass cages ventilated with muslin netting.

Irradiation

Four day-old *D. suzukii* pupae (12 to 24 h prior to adult emergence) were irradiated in a ^{60}Co Gamma Cell 220 (MDS Nordion, Canada) for experiments conducted at the IPCL and in a ^{137}Cs Gamma Cell 3000 (Best Theratronics, Canada) at the Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) for experiments in Canada. Gamma rays emitted by ^{60}Co or ^{137}Cs are similar (C. Cáceres, personal communication), but the two radiation sources differed in their emission rate, which is known to have no effect on emergence, longevity and flight ability of tephritid fruit flies such as *Dacus cucumis* French (Hooper 1975) and *Bactrocera tryoni* Froggatt (Collins et al. 2008). Experiments conducted in Austria and Canada can therefore be merged. Pupae for irradiation and control pupae were transported in a thermal bag to the irradiation center and were thus exposed to the same temperature and humidity conditions. The irradiation doses used in all experiments were 0, 30, 50, 70, 80, 90, 100 or 120 Gy, whereas control pupae were not irradiated.

Adult emergence and deformed flies

A first objective was to correlate irradiation dose applied to pupae with percentage of adult emergence and deformed flies. We first developed a method to allow sexing of the flies and to assure that all individuals were virgin before being transferred to rearing cages following irradiation. A few hours following irradiation, *D. suzukii* pupae were placed individually in the wells of an ELISA plate identified with irradiation dose and date and covered with Parafilm®. On

the following day, plates were observed every few hours from morning to late afternoon for adult emergence. From visual observation, without using anesthesia, each fly was identified through the plastic plate as male or female, and as being healthy or deformed. Sex was assessed through the presence/absence of an ovipositor at the end of the abdomen. Deformed flies included individuals that partially emerged from the pupal case, and individuals whose wings did not fully deploy following emergence. Healthy flies were removed from the plate with an insect aspirator shortly after emergence and used in experiments. The plates were observed for an additional day for late emergence, and the remaining unemerged pupae were classified as dead individuals. A total of 8,958 pupae were examined (~3000 pupae from the control and ~800 pupae for each experimental doses), allocated in 11 replicates (irradiation dates) at CRCHUM. To test for an irradiation dose effect on adult emergence and deformity, two binomial generalized linear models were used in R 3.3.2 (R Development Core Team 2016).

Longevity

We tested the effect of irradiation on the average lifespan of virgin adults in comparison with non-irradiated flies. Upon emergence and sexing, *D. sukikii* adults were placed in groups of ten flies of the same sex in a 15 X 15 X 15 cm plastic cage with access to water and adult diet (white sugar and brewer's yeast). Mortality was recorded each day at 9 AM until all flies had died. Two cages of ten virgin females and two cages of ten virgin males were set up for each dose and the experiment was repeated four times (n=eight cages, for a total of 80 individuals, per sex and per dose). Longevity per dose was analyzed using Kaplan-Meier survival analyses and, for each sex, survival curves were compared using Mantel-Cox log-rank tests using R 3.3.2 (R Development Core Team 2016).

Fecundity

The effect of irradiation dose on fecundity was assessed for (1) ten non-irradiated females mated with ten irradiated males, (2) ten irradiated females mated with ten non-irradiated males and (3) ten non-irradiated virgin females. After emergence and sexing, *D. suzukii* adults were assigned to one of the three treatments. Flies were placed in cages similar to the ones used for longevity test with access to water, adult diet, and an egg-laying site consisting of a Petri dish (4 cm diameter) filled with carrot diet covered with slices of fresh banana. The egg-laying site was renewed three times a week. Following the pre-oviposition period, oviposition was monitored for seven days. Following oviposition, egg-laying sites were immediately observed under a stereomicroscope. *Drosophila suzukii* eggs have two visible white filaments near the anterior end coming out above the surface of the diet and allowing the embryo to breathe, which enable precise egg counting (Lee et al. 2011). For analysis, the numbers of eggs per cage were pooled for the seven-day period.

For each male-female combination, two cages containing ten couples were set up per treatment. The experiment was replicated four times (n=eight cages per combination per dose for mated flies and n=13 cages for virgin females). This experiment was conducted at both the IPCL and the IRDA, with all replicates for doses of 30, 100 and 120 Gy done at the IRDA, replicates for doses of 0, 50, 70, 80, and 90 Gy done equally in both labs and virgin females tested only at the IPCL. Data were analyzed separately for irradiated males and females. For irradiated males, a mixed model was used to examine the effect of irradiation dose on fecundity (total number of eggs laid in seven days per cage containing ten couples), adding the irradiation date as a random variable to consider possible differences between irradiation sites. For irradiated females, a mixed model with Poisson distribution and Dual Quasi-Newton test for

over dispersion of data were used to examine the effect of irradiation dose on fecundity. Analysis was done using R 3.3.2 (R Development Core Team 2016).

Fertility

The effect of irradiation dose on male fertility was examined by assessing egg hatch when non-irradiated females were mated with irradiated males. After emergence and sexing, ten irradiated adult males were placed together with ten non-irradiated females in a cage with access to water, adult diet, and a banana slice. Flies were left together for five days for sexual maturation and mating. Thereafter, with both male and female flies present in the cages, the banana slice was changed twice a day for three consecutive days to sample the eggs. Each day, one of the banana slices was checked under a stereomicroscope (the first one was from 8 AM to 4 PM, the second and third were from 4 PM to 8 AM), and all eggs were carefully taken out with forceps and put on a black filter paper placed on a wet sponge. Eggs were incubated at rearing conditions for 48 h, after which, egg hatch was scored under a stereomicroscope. An average of 150 ± 62 eggs was harvested per cage over three days. Percent hatch was calculated for each cage and used as a measure of male fertility. Two cages containing ten couples were set up per treatment, except for the first replicate when three cages were used per treatment. The experiment was replicated five times (n=eleven cages per treatment). The data were analyzed using a non-linear method (NLIN) describing the decreasing exponential function using SAS 9.4 (SAS Institute Inc. 2016).

F1 survival

Survival of F1 larvae, i.e. descendants of parents of which the male had been exposed to irradiation, was assessed. In contrast to the previous fertility experiment, we used the banana diet because it provided higher survival of *D. suzukii* larvae. Following adult emergence and

sexing, ten irradiated males were placed together with ten non-irradiated females in a cage with access to water, adult diet and 25 ml of banana diet poured into a 4 oz Solo cup without cover as oviposition site. The oviposition site was changed three times a week for two weeks. The eggs on the oviposition site were taken out of the cage and counted under a stereomicroscope. A muslin-covered top was put on the Solo cup that was kept under rearing conditions for eight days, and humidified when necessary. Then, the patch was re-examined for counting the number of pupae formed on top of the diet. The pupae were carefully taken out with forceps and put on a wet makeup cotton pad in a new clean Solo cup of the same size with muslin-covered top. The cotton pad was re-humidified when necessary until adult emergence. Adults were thereafter sexed and counted. The number of eggs, pupae and adults of each sex produced in two weeks were determined for each cage. Two cages containing ten couples were set up per treatment. The experiment was repeated four times (n=eight cages per treatment) and the data were analyzed using a non-linear method (NLIN) describing the decreasing exponential function using SAS 9.4 (SAS Institute Inc. 2016).

F1 fertility

We next assessed the fertility of F1 descendants (produced in the previous experiment), i.e. descendant flies from crossings of partially sterile irradiated males with non-irradiated females (F0). Inherited sterility has been observed in several insect species, particularly in Lepidoptera (Carpenter et al. 2005). Only descendants produced from pairs where the males had been irradiated at doses of 70 Gy and higher were tested. Upon emergence, each descendant was put individually in a 1 oz Solo cup with a muslin-covered top, 5 ml of banana diet and two non-irradiated adults of the opposite sex. Those two non-irradiated adults were replaced if they died before the end of the test. The diet was changed three times during a ten-day period. The diet was humidified and kept for eight days to determine the total number of pupae produced by

each descendant. If the descendant was a male, the number of pupae produced was divided by two since he had been coupled with two females. Since the F0 couples with males irradiated at doses of 70 Gy or more produced few descendants, the number of individuals for this experiment was low, i.e. from two to eleven descendants per dose. Only average and standard deviation of the number of descendants produced per female by each F1 individuals were calculated using R 3.3.2 (R Development Core Team 2016).

Results

Adult emergence and deformed flies

For each dose, gamma ray irradiation of four-day-old *D. sukukii* pupae did not have a significant effect on adult emergence (Binomial generalized linear model; $F=0.2031$, $d.f.=7$, $P=0.663$) and percentage deformed adults (Binomial generalized linear model; $F=0.3031$, $d.f.=7$, $P=0.580$). For each treatment, percentage emergence was high ($88.1 \pm 6.5\%$), and percentage deformed flies was low ($4.0 \pm 2.4\%$) (Fig. 1).

Longevity

For both males and females, irradiation did not have a significant effect on longevity (Mantel-Cox log-rank; $X^2=13.5$, $d.f.=7$, $P=0.062$ for males; $X^2=5.2$, $d.f.=7$, $P=0.635$ for females) (Fig. 2). Males survived from 1 to 36 days while females survived from 1 to 28 days.

Fecundity

On average, 320.4 ± 160.0 eggs were laid per week in control cages, while 275.8 ± 140.9 eggs were laid in cages containing ten irradiated males at any dose and ten non-irradiated females. The number of eggs sampled in one week did not differ significantly with irradiation dose given to the males (control consisted of non-irradiated males and non-irradiated females) (Linear mixed model, $F=0.2290$, $d.f.=7$, $P=0.634$). In cages containing ten non-irradiated males and ten

irradiated females, all irradiation doses drastically reduced the fecundity of *D. sukukii* females (Poisson generalized linear model, $F=53.52$, d.f.=7, $P<0.0001$). Females irradiated with 30 Gy laid 6.3 ± 2.0 eggs and less than one egg per cage was found for all other doses, except with 80 Gy where females had a fecundity of 3.6 ± 1.3 eggs per cage. No difference was found in fecundity of females irradiated with doses of 50 Gy and more (Multiple t-tests, $P>0.05$). Virgin females also laid sterile eggs, with an average of 34 ± 40 eggs per week per ten females (Fig. 3).

Fertility

Egg hatch of non-irradiated *D. sukukii* females mated with irradiated males decreased exponentially with irradiation dose (Regression, pseudo- $R^2 = 0.93$); i.e. from 82.6% in the untreated control cages to 4.0% in cages with males irradiated with 120 Gy (Fig. 4).

F1 survival

Survival from egg to adult of the F1 generation decreased with irradiation dose following an exponential regression curve (pseudo- $R^2 = 0.86$), i.e. from 59.2% in the control cages to 0.2% in cages with males irradiated with 120 Gy (Fig. 5).

F1 fertility

Too few data were obtained on the fertility of the descendants to be statistically analyzed. Nevertheless, results suggest that individuals from the F1 generation that reached the adult stage were fertile, regardless of the irradiation dose of the F0, except for the only F1 female obtained from the 120 Gy irradiated F0 (Table 1).

Discussion

The objective of the present study was to assess the effects of gamma irradiation on several biological attributes of *D. sukukii*. The selection of the optimal irradiation dose for use in an SIT

program is a crucial step that requires careful evaluation under laboratory conditions. The optimal dose should balance high levels of insect sterility with minimal impact on their overall biological quality (Bakri et al. 2005). A small residual fertility can be accepted in situations where the competitiveness of irradiated males is preserved (Toledo et al. 2004, Parker and Mehta 2007). The optimal dose is thus a trade-off between complete sterility and alterations induced in the somatic cells by irradiation.

Gamma irradiation did not cause apparent morphological damage to males and females *D. suzukii*, even at the highest dose tested (120 Gy). Provided that these results are confirmed by further evaluation of the competitiveness of irradiated males under laboratory and field conditions, this suggests that released irradiated males would be as successful as wild males to find and mate with wild females. In addition, sterile insect production facilities will not suffer losses from non-emerging pupae or deformed adults. Such a pattern has been observed in other insect species: irradiation up to 100 Gy did not impair *Anopheles arabiensis* Patton (Diptera: Culicidae) emergence and longevity (Helinski et al. 2006); irradiation with 170 Gy had no effect on emergence and longevity, with or without access to food, of the American serpentine leafminer *Liriomyza trifolii* Burgess (Diptera: Agromyzidae) (Kaspi and Parrella 2003). On the other hand, Amoako-Atta and Partida (1976) showed that irradiation of the almond moth *Cadra cautella* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) with 100 to 300 Gy as late stage pupae had no effect on adult emergence but percentage deformed adults increased from 2 to 10%, while irradiation of younger pupae induced high mortality and a high percentage of deformed adults.

Drosophila suzukii males and females cannot be differentiated at the pupal stage. Since both sexes will have to be released in the field, it is crucial to ensure complete female sterility following irradiation. Females irradiated with doses of 50 Gy and higher were sterile, indicating

that they are more sensitive to gamma irradiation than males. Irradiation of males with 50 Gy resulted in 82.7% embryonic death and 12.2% egg to adult survival. This higher radio-sensitivity of females facilitates the development of an SIT program as it allows the selection of the optimal dose for males. Difference in radio-sensitivity between sexes is a common finding in many insects like the beet leafhopper *Circulifer tenellus* Baker (Hemiptera: Cicadellidae) (Ameresekere and Georghiou 1971), the almond moth (Cogburn et al. 1973), the Indian mealmoth *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae) (Brower 1975) and the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) (Allinghi et al. 2007).

As observed in other insects (Klassen 2005), fecundity of non-irradiated *D. suzukii* females was similar for those mating with non-irradiated or irradiated males for all doses tested. This implies that wild females mated with irradiated males would still damage the fruits when laying sterile eggs, and these oviposition scars would be a port of entry for bacterial and fungal infections (Cini et al. 2012). However, this drawback will gradually wane along with the reduction of wild female *D. suzukii* populations resulting from the release program. Released irradiated females do not oviposit eggs, however it remains unclear if they still pierce the fruits, for feeding. If they do, the development of a genetic sexing strain that produces only males, like the one for the Mediterranean fruit fly (Franz 2005), could be an option not only to avoid producing sterile females, but also to reduce production cost and enhance efficiency of sterile males.

The relationship between *D. suzukii* male fertility (expressed as egg hatch) and irradiation dose is similar to what has been observed in other insects, i.e. a rapid increase of sterility with increasing dose rates (LaChance and Graham 1984), with the greatest sterility (96.0%) obtained with a dose of 120 Gy. Our study provides the first dose-response curves for *D. suzukii*. When examining the use of irradiation for quarantine purposes on fresh fruits infested with *D. suzukii*,

Follett et al. (2014) concluded that a dose of 80 Gy applied to late-stage pupae completely prevented reproduction of emerging adults. In our study, we tested the sterility of *D. suzukii* males and females separately, by mating them with non-irradiated individuals of the opposite sex instead of mating irradiated males with irradiated females.

Although very few individuals were available to explore aspects of the fertility of the F1 generation, our results suggest that offspring of partially sterile males and non-irradiated females are fertile. Therefore, selecting an optimal irradiation dose for *D. suzukii* must be based on the dose-response of the parental F0 generation, and not on inherited sterility since it was not observed in this species. Most cases of inherited sterility have been observed in lepidopteran species (Carpenter et al. 2005), but partial inherited sterility has also been shown in the large milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* Dallas (Hemiptera: Lygaeidae) (LaChance et al. 1970). The pattern of sterilization of *D. suzukii* following irradiation is therefore similar to patterns observed in other fruit flies belonging to the *Tephritidae* family.

This study is the first to consider the SIT as a control technique for *D. suzukii*. Further research is required, for instance to examine competitiveness of irradiated males (Parker and Mehta 2007). Experiments have been undertaken to compare the mating behavior of irradiated and non-irradiated males in the laboratory. The irradiation dose of 120 Gy seems promising as it sterilizes *D. suzukii* pupae without reducing their emergence and longevity or increasing the rate of deformed flies.

Acknowledgments

We are grateful to the FAO/IAEA IPCL staff for their contribution, particularly Thilakasiri Dammalage and Sohel Ahmad for the irradiations. We also thank Alexa Lutteri, Marianne Gousy-Leblanc and Maxence Jacquot-Atuyer for the technical assistance and Michelle Grenier (IRDA)

for statistical analyses. This research was supported by the Programme *Innov'action agroalimentaire* from the agreement *Cultivons L'Avenir 2* concluded between the *Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec* and *Agriculture and Agri-food Canada*. Internship at the IPCL was supported by mobility scholarship from the *Ministère de l'Éducation et de l'Enseignement supérieur du Québec*.

References

- Allinghi, A., C. Gramajo, E. Willink, and J. Vilardi. 2007. Induction of sterility in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) by gamma radiation. *Florida Entomologist* 90:96-102.
- Ameresekere, R., and G. Georghiou. 1971. Sterilization of the beet leafhopper: induction of sterility and evaluation of biotic effects with a model sterilant (OM-53139) and ⁶⁰Co irradiation. *Journal of Economic Entomology* 64:1074-1080.
- Amoako-Atta, B., and G. Partida. 1976. Sensitivity of almond moth pupae to gamma radiation (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 49:133-140.
- Bakri, A., K. Mehta, and D. Lance. 2005. Sterilizing insects with ionizing radiation. Pages 233-268 in V. Dyck, J. Hendrichs, and A. Robinson, editors. *Sterile Insect Technique*. Springer, Pays-Bas.
- Beers, E. H., R. A. Van Steenyk, P. W. Shearer, W. W. Coates, and J. A. Grant. 2011. Developing *Drosophila suzukii* management programs for sweet cherry in the western United States. *Pest Management Science* 67:1386-1395.
- Bolda, M. P., R. E. Goodhue, and F. G. Zalom. 2010. Spotted wing drosophila: potential economic impact of a newly established pest. *Agricultural and Resources Economics Update*, University of California, Giannini Foundation. 13:5-8.
- Brower, J. H. 1975. Gamma Irradiation of Adult *Plodia interpunctella*: Effects on Mating, Sterility, and Number of Progeny. *Annals of the Entomological Society of America* 68:1086-1090.
- Bruck, D. J., M. Bolda, L. Tanigoshi, J. Klick, J. Kleiber, J. DeFrancesco, B. Gerdeman, and H. Spitler. 2011. Laboratory and field comparisons of insecticides to reduce infestation of *Drosophila suzukii* in berry crops. *Pest Management Science* 67:1375-1385.
- Carpenter, J., S. Bloem, and F. Marec. 2005. Inherited sterility in insects. Pages 115-146 in V. Dyck, J. Hendrichs, and A. Robinson, editors. *Sterile Insect Technique*. Springer.

- Cha, D. H., T. Adams, H. Rogg, and P. J. Landolt. 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* 38:1419-1431.
- Chabert, S., R. Allemand, M. Poyet, P. Eslin, and P. Gibert. 2012. Ability of European parasitoids (Hymenoptera) to control a new invasive Asiatic pest, *Drosophila suzukii*. *Biological Control* 63:40-47.
- Cini, A., C. Ioriatti, and G. Anfora. 2012. A review of the invasion of *Drosophila suzukii* in Europe and a draft research agenda for integrated pest management. *Bulletin of Insectology* 65:149-160.
- Cogburn, R. R., E. W. Tilton, and J. H. Brower. 1973. Almond moth: gamma radiation effects on the life stages. *Journal of Economic Entomology* 66:745-751.
- Collins, S., C. Weldon, C. Banos, and P. Taylor. 2008. Effects of irradiation dose rate on quality and sterility of Queensland fruit flies, *Bactrocera tryoni* (Froggatt). *Journal of Applied Entomology* 132:398-405.
- Cormier, D., J. Veilleux, and A. Firlej. 2015. Exclusion net to control spotted wing *Drosophila* in blueberry fields. *IOBC-WPRS Bull* 109:181-184.
- Cossentine, J., M. Robertson, and R. Buitenhuis. 2016. Impact of acquired entomopathogenic fungi on adult *Drosophila suzukii* survival and fecundity. *Biological Control* 103:129-137.
- Cuthbertson, A. G., D. A. Collins, L. F. Blackburn, N. Audsley, and H. A. Bell. 2014. Preliminary screening of potential control products against *Drosophila suzukii*. *Insects* 5:488-498.
- Daane, K. M., X.-G. Wang, A. Biondi, B. Miller, J. C. Miller, H. Riedl, P. W. Shearer, E. Guerrieri, M. Giorgini, and M. Buffington. 2016. First exploration of parasitoids of *Drosophila suzukii* in South Korea as potential classical biological agents. *Journal of Pest Science*:1-13.

- Deprá, M., J. L. Poppe, H. J. Schmitz, D. C. De Toni, and V. L. Valente. 2014. The first records of the invasive pest *Drosophila suzukii* in the South American continent. *Journal of Pest Science* 87:379-383.
- Farnsworth, D., K. Hamby, M. Bolda, R. Goodhue, J. Williams, and F. Zalom. 2016. Economic analysis of revenue losses and control costs associated with the spotted wing drosophila (*Drosophila suzukii* (Matsumura)) in the California raspberry industry. *Pest Management Science*.
- Farnsworth, D. J. 2014. Perspectives on California Berry Production: Labor Availability, Pest Management, and Trade Restrictions [dissertation]. University of California, Davis (CA).
- Follett, P. A., A. Swedman, and D. K. Price. 2014. Postharvest Irradiation Treatment for Quarantine Control of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in Fresh Commodities. *Journal of Economic Entomology* 107:964-969.
- Franz, G. 2005. Genetic sexing strains in Mediterranean fruit fly, an example for other species amenable to large-scale rearing for the sterile insect technique. Pages 427-451 in V. Dyck, J. Hendrichs, and A. Robinson, editors. *Sterile Insect Technique*. Springer.
- Guerrieri, E., M. Giorgini, P. Cascone, S. Carpenito, and C. Van Achterberg. 2016. Species diversity in the parasitoid genus *Asobara* (Hymenoptera: Braconidae) from the native area of the fruit fly pest *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *PLoS One* 11:e0147382.
- Hauser, M. 2011. A historic account of the invasion of *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae) in the continental United States, with remarks on their identification. *Pest Management Science* 67:1352-1357.
- Helinski, M., A. G. Parker, and B. G. Knols. 2009. Radiation biology of mosquitoes. *Malaria Journal* 8:S6.

- Helinski, M. E., A. G. Parker, and B. G. Knols. 2006. Radiation-induced sterility for pupal and adult stages of the malaria mosquito *Anopheles arabiensis*. *Malaria Journal* 5:41.
- Hooper, G. 1975. Sterilization of *Dacus cucumis* French (Diptera: Tephritidae) by gamma radiation. II. Effect of dose rate on sterility and competitiveness of adult males. *Australian Journal of Entomology* 14:175-177.
- Jang, M., J. Kim, K. A. Yoon, S. H. Lee, and C. G. Park. 2016. Biological activity of Myrtaceae plant essential oils and their major components against *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *Pest Management Science*.
- Kaspi, R., and M. P. Parrella. 2003. The feasibility of using the sterile insect technique against *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) infesting greenhouse chrysanthemum. *Annals of Applied Biology* 143:25-34.
- Klassen, W. 2005. Area-wide integrated pest management and the sterile insect technique. Pages 39-68 in V. Dyck, J. Hendrichs, and A. Robinson, editors. *Sterile Insect Technique*. Springer, Pays-Bas.
- Klassen, W., and C. Curtis. 2005. History of the sterile insect technique. Pages 3-36 in V. Dyck, J. Hendrichs, and A. Robinson, editors. *Sterile Insect Technique*. Springer, Pays-Bas.
- Knipling, E. F. 1992. Principles of insect parasitism analyzed from new perspectives. Practical implications for regulating insect populations by biological means. *Agriculture Handbook*, United States Department of Agriculture, United States.
- LaChance, L. E., M. Degruillier, and A. P. Leverich. 1970. Cytogenetics of inherited partial sterility in three generations of the large milkweed bug as related to holokinetic chromosomes. *Chromosoma* 29:20-41.

- LaChance, L. E., and C. K. Graham. 1984. Insect radiosensitivity: dose curves and dose-fractionation studies of dominant lethal mutations in the mature sperm of 4 insect species. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 127:49-59.
- Landolt, P., T. Adams, and H. Rogg. 2012. Trapping spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii* (Matsumura)(Diptera: Drosophilidae), with combinations of vinegar and wine, and acetic acid and ethanol. *Journal of Applied Entomology* 136:148-154.
- Lee, J. C., D. J. Bruck, H. Curry, D. Edwards, D. R. Haviland, R. A. Van Steenwyk, and B. M. Yorgey. 2011. The susceptibility of small fruits and cherries to the spotted-wing drosophila, *Drosophila suzukii*. *Pest Management Science* 67:1358-1367.
- Mitchell, S., N. Tanaka, and L. Steiner. 1965. Methods of mass culturing melon flies and oriental and Mediterranean fruit flies. U.S. Dept Agriculture Rept ARS:33-104: 101-122.
- Oliva, C. F., M. Jacquet, J. Gilles, G. Lemperiere, P. O. Maquart, S. Quilici, F. Schooneman, M. J. Vreysen, and S. Boyer. 2012. The sterile insect technique for controlling populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) on Reunion Island: mating vigour of sterilized males. *PLoS One* 7:e49414.
- Parker, A., and K. Mehta. 2007. Sterile Insect Technique: A model for dose optimization for improved sterile insect quality. *Florida Entomologist* 90:88-95.
- Pimentel, D. 2009. Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. Pages 89-111 in R. Peshin and A. Dhawan, editors. *Integrated pest management: innovation-development process*. Springer.
- R Development Core Team. 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

- Renkema, J. M., D. Wright, R. Buitenhuis, and R. H. Hallett. 2016. Plant essential oils and potassium metabisulfite as repellents for *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *Scientific Reports* 6:21432.
- Robinson, A. 2005. Genetic basis of the sterile insect technique. Pages 95-114 in V. Dyck, J. Hendrichs, and A. Robinson, editors. *Sterile Insect Technique*. Springer, Pays-Bas.
- Rogers, M. A., E. C. Burkness, and W. Hutchison. 2016. Evaluation of high tunnels for management of *Drosophila suzukii* in fall-bearing red raspberries: potential for reducing insecticide use. *Journal of Pest Science*:1-7.
- SAS Institute Inc. 2016. SAS Software. Cary, NC; .
- Smirle, M. J., C. L. Zurowski, M. M. Ayyanath, I. M. Scott, and K. E. MacKenzie. 2017. Laboratory studies of insecticide efficacy and resistance in *Drosophila suzukii* (Matsumura)(Diptera: Drosophilidae) populations from British Columbia, Canada. *Pest Management Science* 73:130-137.
- Tochen, S., D. T. Dalton, N. Wiman, C. Hamm, P. W. Shearer, and V. M. Walton. 2014. Temperature-related development and population parameters for *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) on cherry and blueberry. *Environmental Entomology* 43:501-510.
- Toledo, J., J. Rull, A. Oropeza, E. Hernández, and P. Liedo. 2004. Irradiation of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) revisited: optimizing sterility induction. *Journal of Economic Entomology* 97:383-389.
- Van Timmeren, S., and R. Isaacs. 2013. Control of spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii*, by specific insecticides and by conventional and organic crop protection programs. *Crop Protection* 54:126-133.

- Vreysen, M., J. Gerardo-Abaya, and J. Cayol. 2007. Lessons from Area-Wide Integrated Pest Management (AW-IPM) Programmes with an SIT Component: an FAO//IAEA Perspective. Pages 723-744 Area-Wide Control of Insect Pests. Springer.
- Walse, S. S., R. Krugner, and J. S. Tebbets. 2012. Postharvest treatment of strawberries with methyl bromide to control spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii*. Journal of Asia-Pacific Entomology 15:451-456.
- Walsh, D. B., M. P. Bolda, R. E. Goodhue, A. J. Dreves, J. Lee, D. J. Bruck, V. M. Walton, S. D. O'Neal, and F. G. Zalom. 2011. *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): invasive pest of ripening soft fruit expanding its geographic range and damage potential. Journal of Integrated Pest Management 2:G1-G7.
- Wyss, J. H. 2000. Screwworm eradication in the Americas. Annals of the New York Academy of Sciences 916:186-193.

Table

Table 1: Effect of gamma irradiation dose applied to *D. sukii* males on the fertility of males and females of the F1 generation.

Irradiation dose (Gy)	Descendants produced by females F1 (pupae \pm SD)	<i>n</i>	Descendants produced by males F1 (pupae \pm SD)	<i>n</i>
70	34.5 \pm 28.5	4	46.5 \pm 46.3	3
80	22.8 \pm 21.0	5	46.0 \pm 32.5	6
90	5.3 \pm 5.51	3	9.7 \pm 9.9	4
100	21.7 \pm 28.2	3	64.9 \pm 65.9	4
120	0	1	57.0	1

n = number of F1 descendants.

Figures

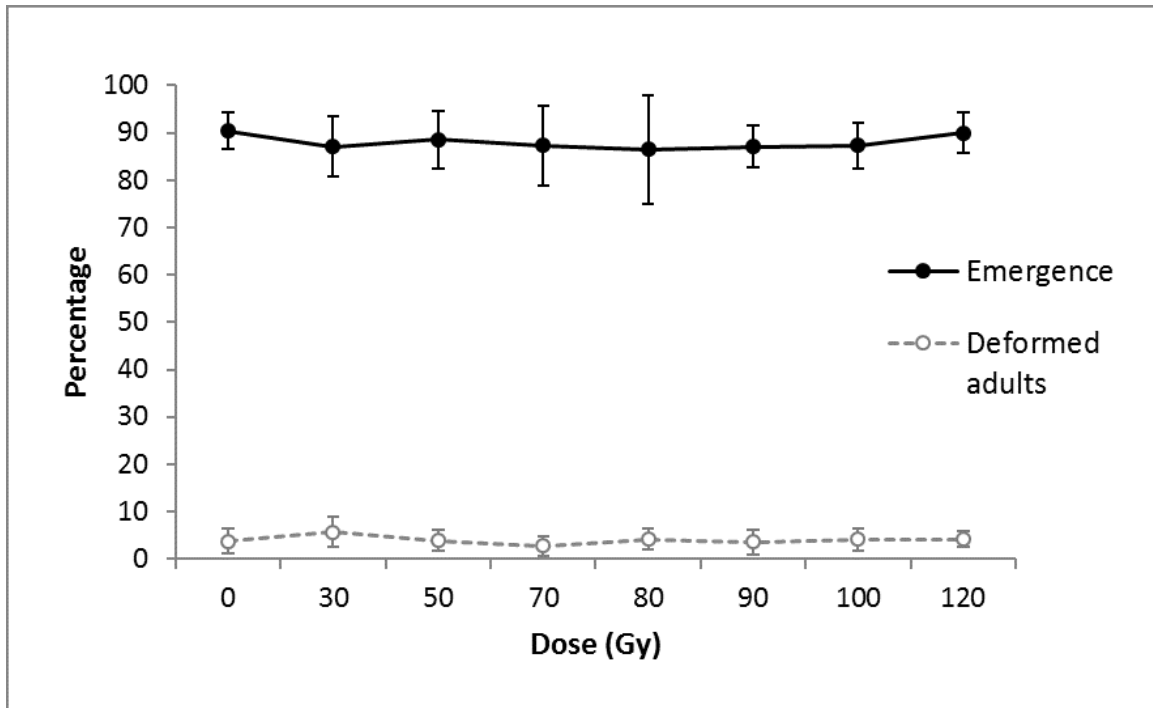


Figure 1: Effect of irradiation dose on percent *D. sukii* adult emergence and percentage deformed adults. Significances were measured with binomial generalized linear models ($P > 0.05$).

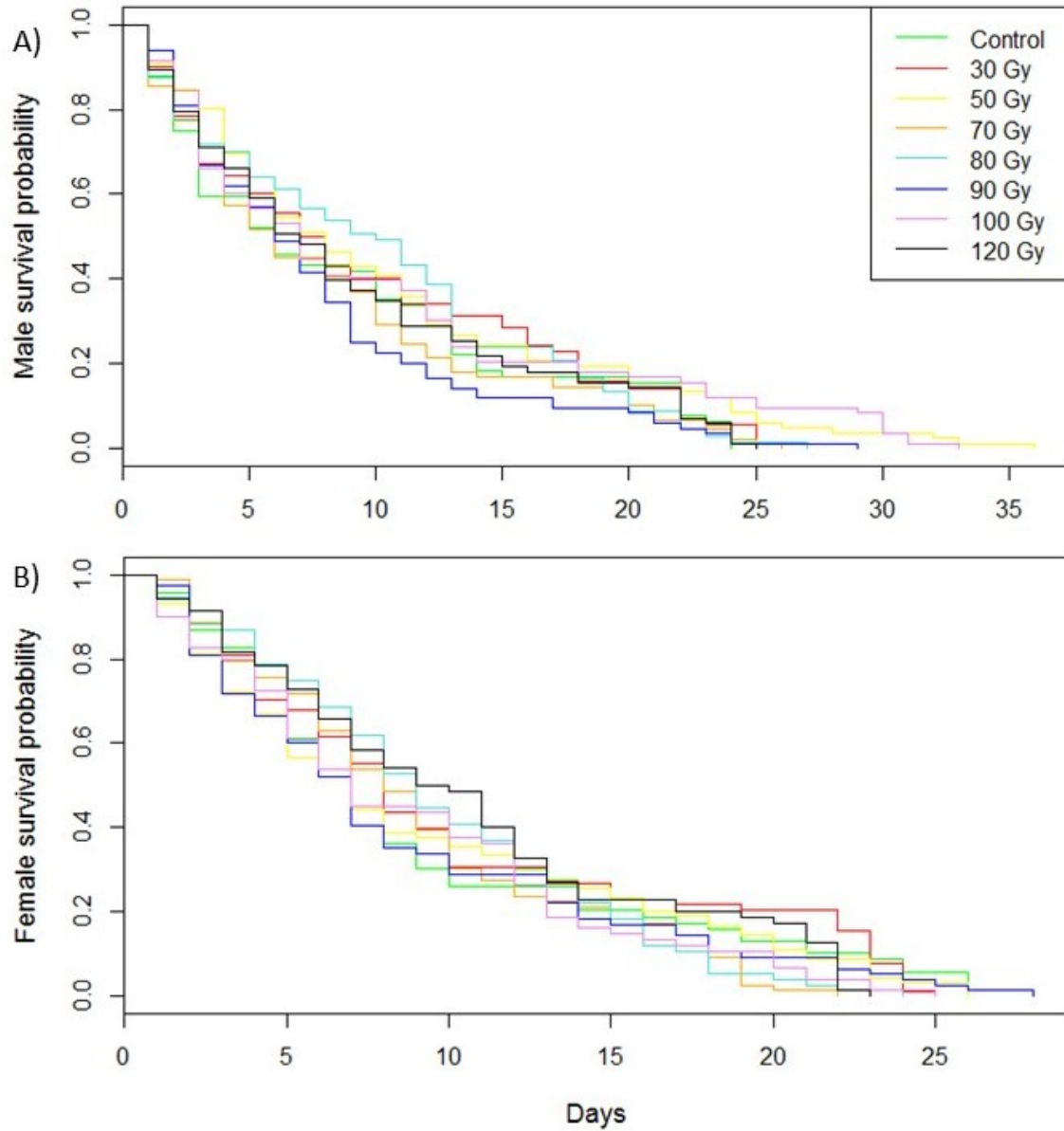


Figure 2: Effect of irradiation dose on longevity of *D. sukikii* (A) males and (B) females when flies had access to food and water. Significance were measured with Mantel-Cox log-rank test ($P > 0.05$).

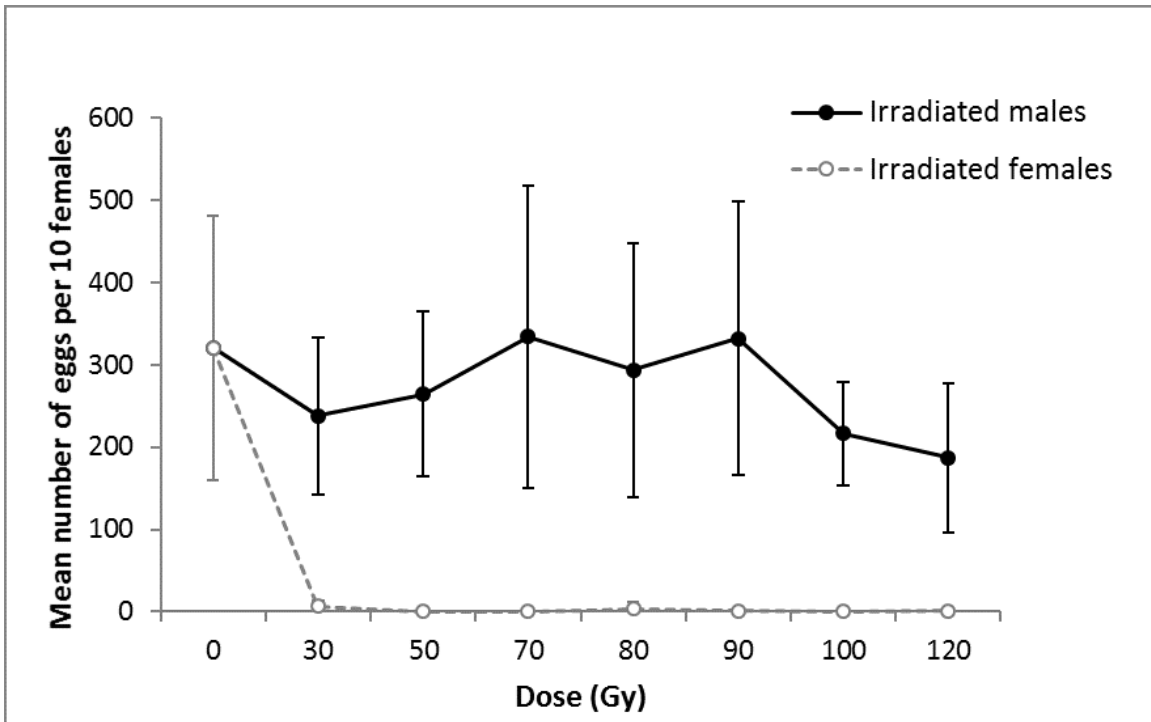


Figure 3: Effect of irradiation dose on *D. sukuzii* fecundity (number of eggs oviposited in one week per ten couples) when either males or females were irradiated. Significance was measured with a Linear mixed model for irradiated males ($P > 0.05$) and a Poisson generalized linear model for irradiated females ($P < 0.0001$).

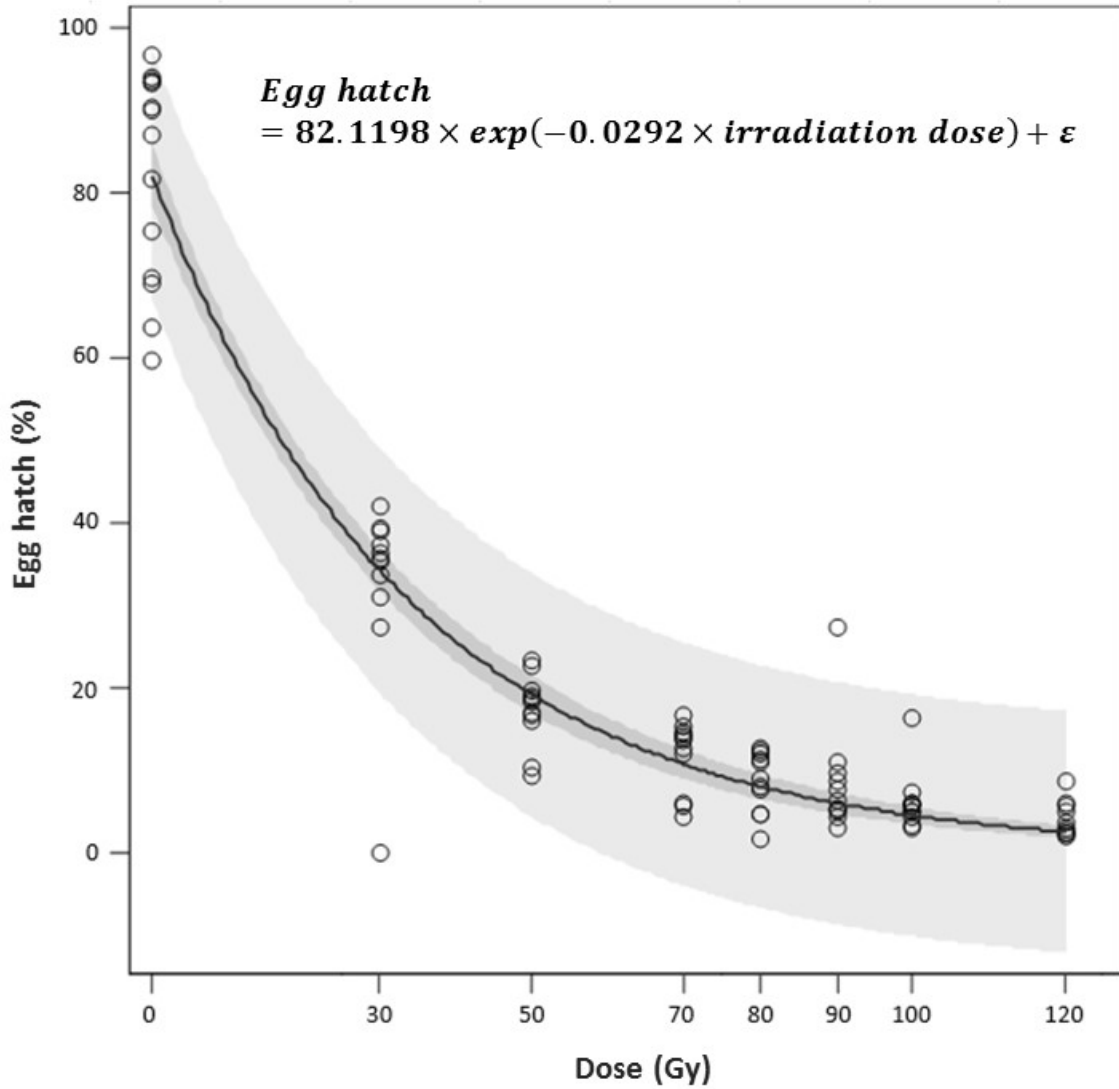


Figure 4: Effect of irradiation dose on egg hatch when non-irradiated *D. sukuzii* females were mated with irradiated males. Dark and pale shaded areas represents 95% confidence limits and 95% prediction limits, respectively.

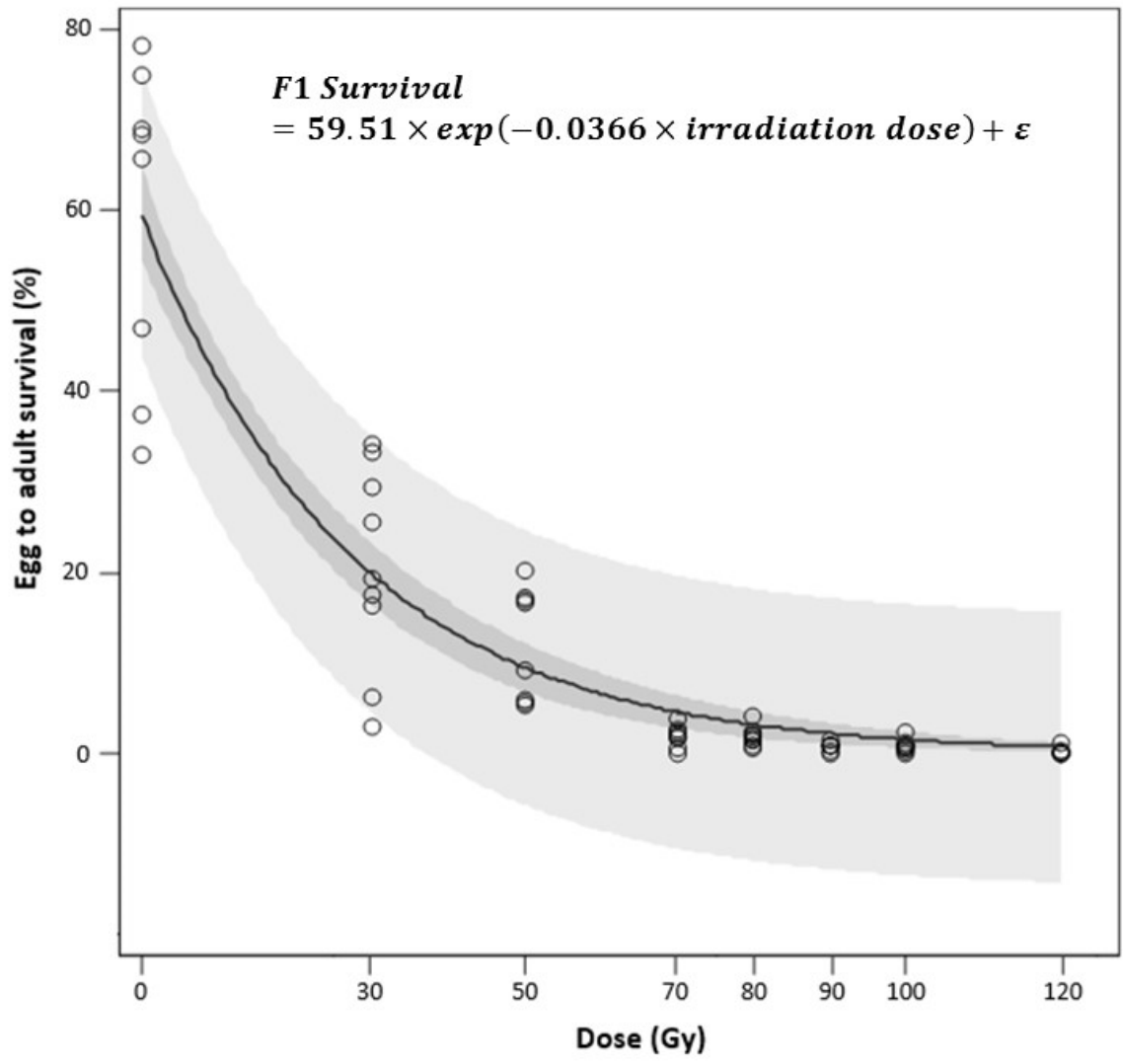


Figure 5: Effect of irradiation dose on survival to adult stage of eggs laid by non-irradiated *D. sukuii* females when mated with irradiated males. Dark and pale shaded areas represents 95% confidence limits and 95% prediction limits, respectively.

**Chapitre 3 : Mating capacity and competitiveness of *Drosophila*
suzukii males after irradiation treatment and study of female
remating**

Geneviève Lanouette, Jacques Brodeur, François Fournier, Véronique Martel and Annabelle
Firlej

En préparation

Mating capacity and competitiveness of *Drosophila suzukii* males after irradiation treatment and study of female re-mating

G. Lanouette¹, J. Brodeur², F. Fournier³, V. Martel⁴, and A. Firlej¹

¹Institut de recherche et de développement en agroenvironnement, Saint-Bruno-de-Montarville (Québec), Canada J3V 0G7

²Institut de recherche en biologie végétale, Université de Montréal, Montréal (Québec), Canada H1X 2B2

³Collège Montmorency, Laval (Québec), Canada H7N 5H9

⁴Centre de foresterie des Laurentides, Ressources naturelles Canada, Québec (Québec), Canada G1V 4C7

Corresponding author:

Geneviève Lanouette

Institut de recherche et de développement en agroenvironnement

335 Rang des Vingt-Cinq Est

Saint-Bruno-de-Montarville, Québec

J3V 0G7, Canada

Email : genevieve.lanouette@umontreal.ca

Abstract

The sterile insect technique is an additional approach for the integrated management of the *Drosophila suzukii*, a new invasive pest. We evaluated in laboratory conditions the mating capacities of irradiated *D. suzukii* males in absence of competition and their competitiveness against non-irradiated males. Finally, we explored female's remating, and if it was affected by males' treatment. Four-day-old pupae were irradiated with dose of 120 Gy in Gammacell 3000. We observed that irradiated males are fully capable to mate and transfer sperm to females, copulating with 6.4 ± 1.9 females in 24 h period, vs. 6.9 ± 2.0 females for non-irradiated males without significant difference. Irradiated males competitiveness was evaluated at 37.5%, but not significantly different from competitiveness of non-irradiated males. Female remating can be considered infrequent and non-significantly influenced by male treatment; as we observed 7.4% of the females first mated with control males and 18.8% of the females first mated with irradiated males to remate when given the opportunity two days and four days after the first mating. Latency and mating duration were not influenced significantly by male treatment, but by presence of male competition. We suggest a dose of 120 Gy be revised and considered to be lowered by further research into SIT as a control method for *D. suzukii*.

Keywords: Spotted wing drosophila, sterile insect technique, sterilization, latency, mating duration

Introduction

Drosophila suzukii Matsumura (Diptera: Drosophilidae) has rapidly become a major pest of berries and stone fruits since it invaded both Europe and America in 2008 (Walsh et al. 2011). Unlike other fruit flies, it has the ability to laid eggs in healthy, ripening fruits, causing revenue losses of \$US 39.8 million to California raspberry production between 2009 and 2014 and significantly increasing production costs (Farnsworth et al. 2016). The industry relies mainly on chemical management of *D. suzukii*, thereby increasing the risks and consequences of the pest developing insecticide resistance. Potential alternatives to insecticides mainly include biological control with parasitoids (Chabert et al. 2012, Daane et al. 2016, Guerrieri et al. 2016, Knoll et al. 2017) and predators and microorganisms (Cuthbertson et al. 2014, Cuthbertson et Audsley 2016), physical control like exclusion nets (Cormier et al. 2015), and the sterile insect technique (SIT) (Lanouette et al. submitted).

The SIT consists of mass-rearing the pest species, exposing individuals to radiation to induce sterility, and releasing overwhelming numbers of sterile insects in the environment. Sterile males are then expected to seek and mate with wild females, preventing them to produce progeny. Releases of sterile males over a number of generations allow the reduction of the pest population under an acceptable threshold (Klassen 2005). Several pest species, including Tephritid fruit flies, have been successfully controlled with SIT worldwide (Klassen 2005). A research initiative has recently been lunched to examine the feasibility of using SIT to control *D. suzukii* populations in berry fruit production. As a first step, Lanouette et al. (submitted) reported that a suitable level of sterilization of four-day-old pupae can be achieved using gamma irradiation at a dose of 120 Gy. Furthermore, irradiation did not induce morphological deformations in males.

The success of an SIT depends greatly on the capacity of producing sterile males that can find and mate with wild females in the field (Pérez-Staples et al. 2013). We will therefore study the mating capacity of the sterile males without competition, as it would be if releases reach high levels of sterile to wild males, but also their capacity in competitive conditions, as if wild males were still present in the fields. Released sterile males should display the same courtship behavior and be as competitive as wild males in order to mate with wild females.

Sexual behavior varies greatly among *Drosophila* species (Markow and O'Grady 2008). For *D. suzukii*, Revadi et al. (2015) showed under laboratory conditions that mating can occur all over the photoperiod, but the highest copulation rate was observed in the morning, within the first 30 minutes following the onset of the photoperiod. *Drosophila suzukii* females do not respond to a male sex pheromone (*cis*-vaccenyl acetate) as observed in many *Drosophila* species (Dekker et al. 2015), but they produced a cuticular hydrocarbon (CHC) used by males for recognition (Revadi et al. 2015). *Drosophila suzukii* males' courtship behavior includes substrate borne vibrations produced by abdominal quivering while males remain motionless or as "toots" while males are chasing females (Mazzoni et al. 2013). Furthermore, *D. suzukii* males have black spots on their wings that can be visually displayed by wing extension during courtship; wing vibration is also a part of courtship (Fuyama 1979, Mazzoni et al. 2013, Revadi et al. 2015).

Competitiveness of sterile males is a prerequisite of a SIT program, but is unlikely that irradiated males would be as competitive as wild, non-irradiated conspecifics (Lance and McInnis 2005). While other factors can have a deteriorating effect on male quality in SIT programs, such as continuous laboratory rearing for years, high population density, artificial diets and handling conditions during mass-rearing, the irradiation process can also directly induce competitiveness loss. In addition to reproductive cells, somatic cells are also irradiated and can undergo

mutations (Robinson 2002). This is why irradiation is generally performed at late-pupal or adult stage, when almost only reproductive cells are multiplying and subjected to malformations (Lance and McInnis 2005).

Another aspect to consider in a SIT program is female re-mating. This causes a problem when females primary mated to irradiated males are more inclined to re-mate or when irradiated males are not as competitive as non-irradiated males, the latter having higher probabilities of inseminating wild females with fertile sperm (Barclay 2005). For example, the receptivity of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) females is less reduced following a mate with an irradiated, sterile male than with a wild male (Kraaijeveld and Chapman 2004). For *D. suzukii*, re-mating behavior was observed by Revadi et al. (2015) but not investigated further. According to Markow (2002), *Drosophila* species displaying a sexual dimorphism, as for *D. suzukii* males having black spots on their wings, tend to have infrequent female re-mating. *Drosophila* males invest in external morphological characters when sexual selection occurs before mating (infrequent female re-mating), or in ejaculate features, such as sperm gigantism, when sexual selection occurs after mating (overlapping ejaculates, frequent female re-mating) (Markow 2002). The same analysis also showed that *Drosophila* species from the group *Melanogaster*, the one that *D. suzukii* belongs to (Hauser 2011), all share the evolutionary feature of infrequent female re-mating.

No previous research has studied the behavior of irradiated *D. suzukii* males, a critical aspect to consider for SIT. The objectives of this study were to (i) determine the mating capacity of irradiated males, (ii) perform competition experiments to compare mating success of irradiated males vs. non-irradiated males, and (iii) explore female re-mating behavior following a first mate with irradiated or non-irradiated males.

Material and methods

All experiments took place at the Institut de Recherche et de Développement en Agroenvironnement (IRDA), St-Bruno-de-Montarville, Québec, Canada using an Italian strain of *D. suzukii* collected from wine grapes in 2012 in Trentino region and reared at IRDA since February 2016. Rearing procedures and methods of egg laying and extraction of pupae from the artificial diets are described in Lanouette et al. (submitted). Tests were performed under control conditions at $23 \pm 1^\circ\text{C}$, $50 \pm 10\%$ HR, and a photoperiod of 16:8 L:D.

Irradiation

Four-day-old *D. suzukii* pupae (12 to 24 h before emergence) were irradiated at the Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) in a Gammacell 3000 (Best Theratronics, Canada) with ^{137}Cs source. Pupae for irradiation and control pupae were brought in a thermal bag to the irradiation center and were thus exposed to the same temperature and humidity conditions. All tests included the same numbers of non-irradiated males (control) and males irradiated with dose of 120 Gy. Pupae from a given rearing cohort were assigned randomly to each treatment.

For all experiments, three-day-old adult males and five-day-old adult females were used to ensure sexual maturity and high levels of mating (G. Lanouette, unpublished data). Pupae were isolated after irradiation and individuals sexed on the day of emergence. They were separated in 1L box according to their sex, treatment and day of emergence. Adults were provided with sucrose: yeast (3:1), a piece of banana diet (Chabert et al. 2012) and water.

Mating capacity

We first compared the mating capacity of irradiated males and non-irradiated males in the absence of competition, when males were alone with females. Each male was placed in a 100mm Petri dish with ten females and a small piece of banana diet for 24 h at $23 \pm 1^\circ\text{C}$, $50 \pm 10\%$ HR, and a photoperiod of 16:8 L:D). The male was next removed from the Petri dish and females were transferred alive at $8 \pm 2^\circ\text{C}$ for zero to three days until dissection. The presence of transferred sperm was used to assess the number of females mated by each male. The spermatheca and seminal receptacle were taken out of the female abdomen by pulling on the ovipositor. The organs were put on a slide with a drop of 1% salted water, covered with a coverslip. A light pressure was then applied with the thumb to break the spermatheca and release the spermatozooids. Immediate observation of all structures was performed using a microscope at 400 magnification to score the presence/absence and location of spermatozooids in three different storage organs: spermatheca, spermathecal tubes, seminal receptacle.

This experiment was conducted using five irradiated males and five non-irradiated males per cohort, and repeated four times (Total of 20 males per treatment). The number of mated females per male and the presence/absence of spermatozoa in each storage organ per mated female were compared using binomial general linear models according to male treatment.

Competitiveness

The competitiveness of irradiated vs. non-irradiated males was next assessed by scoring female mating choice in 47 mm Petri dish containing three virgin flies: one irradiated male, one non-irradiated male and one female. The behavior of the flies was recorded using a camera (Dino-Lite Digital microscope (Model AM4012N2T, Taiwan) with 720 x 576 pixels resolution and 25 pictures/second) placed above the experimental arena. Filming started when flies were introduced in the Petri dish and ended following a first mating, for a maximum of three hours in

case of no mating. Males were introduced first in the arena, alternating the sequence between irradiated and non-irradiated individuals; the female was always introduced last. All flies were introduced within a 20 minutes period. In the laboratory, *D. suzukii* mate mostly in the first half-hour after opening of the lights (Revadi et al. 2015), tested flies were therefore introduced in the arena in darkness conditions using a red light. Low level of activity was observed in darkness, but in a few cases mating occurred and flies were then discarded. A small piece of banana diet was also put inside the arena since *D. suzukii* use substrate-borne vibrations during courtship (Mazzoni et al. 2013). A total of 60 arenas were set-up and 48 mating events were recorded.

Videos were watched with video player Kinovea (open source) using the slide by slide tool, if necessary. Sequences were analyzed with CowLog (Hänninen 2009) to quantify the frequency and duration of the following behaviors: immobile (include grooming), walking and courting (any behaviors aimed at attracting a mate) (Revadi et al. 2015). Number of rejections (decamping, kicking, spinning or abdominal depression) by the female following a mating attempt by a male was also scored (Revadi et al. 2015). Latency period (i.e., time between opening of the light and beginning of mating) and mating duration were calculated and finally, the male successful in mating the virgin female was consider as the “winner” of the competitiveness experiment.

Recording the competitive experiment allows to compare time budget of the males, as we know irradiation can cause passivity and loss of reproductive investment in males (Lux et al. 2002). Percentage of time allocated to different behaviors was calculated for both males and compared with a non-parametric Kruskal-Wallis test. Numbers of rejections for each type of males was compared using a Poisson general linear model according to male treatment. Proportion of females mating with irradiated vs. non-irradiated males was compared with using Exact test of goodness to fit.

Female re-mating

We examined the propensity of *D. sukukii* females to re-mate as influenced by the treatment of the male (irradiated vs. non-irradiated) at the first mating. Twenty irradiated males and 20 non-irradiated males were put individually in Petri dishes with a small piece of banana diet. As a first step, each of them was provided with one virgin female for two hours. Flies were introduced in the experimental arena following the method described above. The observer noted the beginning and ending of mating, if it occurred, and calculated the latency period and mating duration. After two hours, males and non-mated females were discarded. Mated females were kept individually in a small cup with banana diet to allow oviposition. As a second step, two days after the first mating, each female was provided with a new male, once again for two hours at the opening of the lights. The same observation were done. If no mating occurred during this encounter, the female was provided with a third male from the same treatment as the second male four days after the first mating using the same conditions. The following four scenarios were tested:

- 1- First mate with an irradiated male, then access to an irradiated male
- 2- First mate with an irradiated male, then access to a non-irradiated male
- 3- First mate with a non-irradiated male, then access to a non-irradiated male
- 4-First mate with a non-irradiated male, then access to an irradiated male

The experiment was repeated four times. Damaged flies and those that were not active during the test were not included in the analysis (total of six flies eliminated).

Mating success of non-irradiated and irradiated males with virgin females was compared using a binomial linear model. The same model was used to determine if female re-mating was influenced by the following factors: first mate with an irradiated male, second presentation with an irradiated male, first mate duration, time since the first mate (two or four days).

Latency and mating duration were compared between male treatment (non-irradiated or irradiated) and between mating conditions (non-competitive with results from the female re-mating experience or competitive with results from the competitiveness experiences; both tests were performed one week apart) by means of two ANOVAs using the data from the mating capacity experiment and re-mating experiment (from the first mating). Latency indicates the efficacy of the males to find and courtship the females, knowing that in a SIT context, males will have to find the females over a much larger arena. Mating duration is positively correlated to the males' ejaculate investment and to its sperm being increasingly used in a polygamy context (Bretman et al. 2009). All data analysis were performed using R 3.3.2 (R Development Core Team 2016).

Results

Mating capacity

There was no significant difference in the mating capacity of irradiated and non-irradiated males (Binomial linear model: $Z=-0.951$, $d.f.=1$, $P=0.342$). During the 24 h period, non-irradiated and irradiated males (at 120 Gy) mated an average of 6.9 ± 2.0 females and 6.4 ± 1.9 females, respectively.

Irradiation had no effect on sperm storage in female reproductive organs. Sperm (presence/absence) was observed in similar proportions in the spermatheca (Binomial linear models: $Z=-0.899$, $d.f.=1$, $P=0.369$), spermathecal tubes ($Z=-0.950$, $d.f.=1$, $P=0.342$) and seminal receptacle ($Z=-0.842$, $d.f.=1$, $P=0.400$) following mating with non-irradiated or irradiated males (Fig. 6).

Competitiveness

Irradiated *D. sukuzii* males (37.5%; N = 48) were as successful as non-irradiated males (62.5%) in mating with females (Exact test of goodness to fit: 95% confidence interval= 0.240 - 0.527, P=0.111), although there is trend in favor of non-irradiated males.

Time spent resting, walking without interacting with females or courting the female were similar and non-significantly different for both treatments (Kruskal –Wallis: $X^2=0.475$, d.f.=1, P=0.491; $X^2=0.409$, d.f.=1, P=0.5223; $X^2=2.895$, d.f.=1, P=0.089; respectively) (Fig. 7). Number of rejections made by females before accepting a mate did not vary towards non-irradiated (1.4 ± 2.2) and irradiated (1.4 ± 2.7) males (Poisson linear model: Z=0.475; d.f.=1, P=0.635).

Female re-mating

During the first mating period (2 h), irradiated males (59.8%; 49 matings out of 82) were more successful in mating with virgin females than non-irradiated males (40.8%; 29 matings out of 71) (Z=0.789, d.f.=1, P=0.017). Remating occurred uncommonly after two (8.1%; 6 females out of 74) and four (7.7%; 5 females out of 65) days, either for females first mated with non-irradiated (7.4%) or irradiated males (18.8%). None of the tested variables had a significant impact on remating: First mating with irradiated male (Z=1.212, d.f.=1, P=0.223; Binomial linear model), second mating with an irradiated male (Z=-0.666, d.f.=1, P=0.505), duration of the first mating (Z=0.969, d.f.=139, P=0.333), interval between mates (Z=-0.066, d.f.=1, P=0.947) (Fig. 8).

Latency before mating was shorter when males were in competitive conditions (ANOVA: F=27.042, d.f.=1, P<0.0001), but latency was not different between non-irradiated and irradiated males (F=0.208, d.f.=1, P=0.448) (Fig. 9). Similarly, mating duration was shortened when males were in competition (ANOVA, F=7.306, d.f.=1, P=0.008), but it was not affected by male irradiation (F=0.379, d.f.=1, P=0.539) (Fig. 9).

Discussion

The objective of the study was to compare mating capacities of irradiated and non-irradiated *D. suzukii* males in non-competitive and competitive conditions. We also examined if male irradiation has any effect on propensity of females to re-mate. We observed no difference in the number of mates within a 24 h period between irradiated and control males. However, during the re-mating experiment, irradiated males were more performant than non-irradiated males to mate with a female during the two hours period.

When males were competing for a female, the performance of irradiated males did not significantly differ from non-irradiated males. This result is interesting in the context of a SIT program, as reduction of mating capacity should be avoided in irradiated males. Similar results have been observed in other species irradiated in SIT context: for the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae), the low dose of irradiation (35 Gy) did not affect the male's competitiveness, while the high doses (70 and 140 Gy) reduced its ability to mate a virgin female in non-competitive conditions (Lux et al. 2002). For the West Indian fruit fly *Anastrepha obliqua* Macquart (Diptera: Tephritidae): the competitiveness of the irradiated males, estimated as proportion of eggs laid by females in competitive conditions that did not hatch, was reduced with the augmentation of the irradiation dose (40, 60 and 80 Gy were tested) (Toledo et al. 2004). In contrast, Allinghi et al. (2007) found no difference in the competitiveness of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) males irradiated at three different doses (40, 70 and 100 Gy) and non-irradiated males in field cages. Reduced competitiveness of irradiated males needs to be monitored during the following steps of adaptation of the SIT to the pest to confirm the efficacy of the program. Lower competitiveness of irradiated males could (i) be compensated for by using high ratios of irradiated to wild males in SIT releases, (ii) be avoided by reducing the irradiation dose (Parker

and Mehta 2007) or (iii) be compensated by increasing irradiated male size when mass-produced. Size has been associated with higher irradiated males competitiveness in fruit fly (Artiaga-López et al. 2004) and with greater lifetime mating success in the congeneric *D. melanogaster* (Partridge and Farquhar 1983). Competitiveness of males *D. melanogaster* has also been showed to improve with age from two to eight-day-old (Long et al. 1980), and we tested the competitiveness of males *D. sukuzii* with two-day-old individuals.

We observed infrequent female re-mating when given the opportunity two and four days after the first mating. The choice to re-mate was not influenced by the treatment of the first partner (7.4% of females mated to non-irradiated males and 18.8% of females mated to irradiated males re-mated), by treatment of the second partner, or by the length of the first mating. Female re-mating has been studied in *D. melanogaster*. Using repetitive 30 minutes contact periods, Manning (1962) did not observe re-mating for a 48h period, while Fuerst et al. (1973) observed re-mating during a continuous 24 h contact period. They concluded that multiple mating is influenced by the length of the contact period and by female age. In our experiment, we used repetitive 2 h contact periods, which could explained the low re-mating. Female re-mating could be further studied using longer contact period or expanding the interval between males presentation to learn if females will accept at a higher rate a second mating later. Additional study could also check sperm usage by females mated to both irradiated and non-irradiated males by observing their egg hatch.

The latency and the duration of mating vary between non-irradiated and irradiated males of different species. Latency was longer for irradiated *C. capitata*, shorter for irradiated *B. tryoni* and similar for irradiated *A. fraterculus*, while mating duration was similar for irradiated *C. capitata* and *B. tryoni* and shorter for irradiated *A. fraterculus* (Lux et al. 2002, Allinghi et al.

2007, Radhakrishnan et al. 2009). For *D. sukii*, the irradiation treatment did not affect the mating latency and duration. This suggests that males irradiated at dose of 120 Gy have a normal mating behavior, which is important when used in an SIT program. Interestingly, we observed that mating occurring under competitive conditions occurred more rapidly and were shorter for both non-irradiated and irradiated males. Having two males in the experimental arena likely increases the probability of encounter with the female. During mating, interference by the second male may result in shorter mating duration.

Overall, we observed that an irradiation dose of 120 Gy applied to four-day old pupae does not affect male mating performance in non-competitive or competitive conditions. Irradiated males are fully able to mate with similar number of females as non-irradiated males when in absence of competition, have similar latency and mating duration as non-irradiated males. Furthermore, the experiments took place in limited space (Petri dishes) where interactions between males and females are «forced». The copulation rates obtained this way can be higher than what will be observed in the field. Experiments would gain to be repeated in semi-field conditions with larger cages that represent better the conditions of a SIT program.

This is the first study of irradiation effects on *D. sukii* behavior and represents an important step in the development of an SIT program against the pest. Other aspects still need to be studied to allow a better judgement of the optimal irradiation dose. We suggest the investigation be continued by obtaining the Fried competitiveness index (Fried 1971) of males irradiated at various doses. This index represents the proportion of non-fecund eggs being laid in a population where females, non-irradiated males and irradiated males cohabit. It can be obtained from semi-field cages and allow seeing if a lower irradiation dose would be more

efficient, but should also be continuously obtained from wild flies during a SIT program to verify its performance (Vreysen 2005).

Acknowledgments

We are grateful to Marianne Gousy-Leblanc and Maxence Jacquot-Atuyer for technical assistance, to Guy Boivin (CRDH) for advices and to Michelle Grenier (IRDA) for statistical expertise. This research was supported by the Programme *Innov'action agroalimentaire* from the agreement *Cultivons L'Avenir 2* concluded between the *Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec* and *Agriculture and Agri-food Canada*.

References

- Allinghi, A., G. Calcagno, N. Petit-Marty, P. Gómez Cendra, D. Segura, T. Vera, J. Cladera, C. Gramajo, E. Willink, and J. César Vilardi. 2007. Compatibility and competitiveness of a laboratory strain of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) after irradiation treatment. *Florida Entomologist* 90:27-32.
- Artiaga-López, T., E. Hernández, J. Domínguez-Gordillo, D. Moreno, and D. Orozco-Dávila. 2004. Proceedings of the 6th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance.
- Barclay, H. 2005. Mathematical models for the use of sterile insects. Pages 147-174 *Sterile Insect Technique*. Springer.
- Bretman, A., C. Fricke, and T. Chapman. 2009. Plastic responses of male *Drosophila melanogaster* to the level of sperm competition increase male reproductive fitness. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 276:1705-1711.
- Chabert, S., R. Allemand, M. Poyet, P. Eslin, and P. Gibert. 2012. Ability of European parasitoids (Hymenoptera) to control a new invasive Asiatic pest, *Drosophila suzukii*. *Biological Control* 63:40-47.

- Cormier, D., J. Veilleux, and A. Firlej. 2015. Exclusion net to control spotted wing *Drosophila* in blueberry fields. IOBC-WPRS Bull 109:181-184.
- Cuthbertson, A. G., L. F. Blackburn, and N. Audsley. 2014. Efficacy of Commercially Available Invertebrate Predators against *Drosophila suzukii*. Insects 5:952-960.
- Daane, K. M., X.-G. Wang, A. Biondi, B. Miller, J. C. Miller, H. Riedl, P. W. Shearer, E. Guerrieri, M. Giorgini, and M. Buffington. 2016. First exploration of parasitoids of *Drosophila suzukii* in South Korea as potential classical biological agents. Journal of Pest Science:1-13.
- Dekker, T., S. Revadi, S. Mansourian, S. Ramasamy, S. Lebreton, P. G. Becher, S. Angeli, O. Rota-Stabelli, and G. Anfora. 2015. Loss of *Drosophila* pheromone reverses its role in sexual communication in *Drosophila suzukii*. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences 282:20143018.
- Farnsworth, D., K. Hamby, M. Bolda, R. Goodhue, J. Williams, and F. Zalom. 2016. Economic analysis of revenue losses and control costs associated with the spotted wing drosophila (*Drosophila suzukii* (Matsumura)) in the California raspberry industry. Pest Management Science.
- Fried, M. 1971. Determination of sterile-insect competitiveness. Journal of Economic Entomology 64:869-872.
- Fuerst, P., W. Pendlebury, and J. Kidwell. 1973. Propensity for multiple mating in *Drosophila melanogaster* females. Evolution:265-268.
- Fuyama, Y. 1979. A visual stimulus in the courtship of *Drosophila suzukii*. Experientia 35:1327-1328.
- Guerrieri, E., M. Giorgini, P. Cascone, S. Carpenito, and C. Van Achterberg. 2016. Species diversity in the parasitoid genus *Asobara* (Hymenoptera: Braconidae) from the native area of the fruit fly pest *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). PLoS One 11:e0147382.

- Hänninen, L. P., M. 2009. CowLog: Open source software for coding behaviors from digital video. *Behavior Research Methods*. 41(2), 472-476.
- Hauser, M. 2011. A historic account of the invasion of *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae) in the continental United States, with remarks on their identification. *Pest Management Science* 67:1352-1357.
- Klassen, W. 2005. Area-wide integrated pest management and the sterile insect technique. Pages 39-68 in V. Dyck, J. Hendrichs, and A. Robinson, editors. *Sterile Insect Technique*. Springer, Pays-Bas.
- Knoll, V., T. Ellenbroek, J. Romeis, and J. Collatz. 2017. Seasonal and regional presence of hymenopteran parasitoids of *Drosophila* in Switzerland and their ability to parasitize the invasive *Drosophila suzukii*. *Scientific Reports* 7.
- Kraaijeveld, K., and T. Chapman. 2004. Effects of male sterility on female remating in the Mediterranean fruitfly, *Ceratitidis capitata*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 271:S209-S211.
- Lance, D., and D. McInnis. 2005. Biological basis of the sterile insect technique. Pages 69-94 in V. Dyck, J. Hendrichs, and A. Robinson, editors. *Sterile Insect Technique*. Springer, Pays-Bas.
- Long, C. E., T. A. Markow, and P. Yaeger. 1980. Relative male age, fertility, and competitive mating success in *Drosophila melanogaster*. *Behavior Genetics* 10:163-170.
- Lux, S., J. Vilardi, P. Liedo, K. Gaggi, G. Calcagno, F. Munyiri, M. Vera, and F. Manso. 2002. Effects of irradiation on the courtship behavior of medfly (Diptera, Tephritidae) mass reared for the sterile insect technique. *Florida Entomologist* 85:102-112.
- Manning, A. 1962. A sperm factor affecting the receptivity of *Drosophila melanogaster* females. *Nature* 194:252-253.

- Markow, T. A. 2002. Perspective: female remating, operational sex ratio, and the arena of sexual selection in *Drosophila* species. *Evolution* 56:1725-1734.
- Markow, T. A., and P. O'Grady. 2008. Reproductive ecology of *Drosophila*. *Functional Ecology* 22:747-759.
- Mazzoni, V., G. Anfora, and M. Virant-Doberlet. 2013. Substrate vibrations during courtship in three *Drosophila* species. *PLoS One* 8:e80708.
- Parker, A., and K. Mehta. 2007. Sterile Insect Technique: A model for dose optimization for improved sterile insect quality. *Florida Entomologist* 90:88-95.
- Partridge, L., and M. Farquhar. 1983. Lifetime mating success of male fruitflies (*Drosophila melanogaster*) is related to their size. *Animal Behaviour* 31:871-877.
- Pérez-Staples, D., T. E. Shelly, and B. Yuval. 2013. Female mating failure and the failure of 'mating' in sterile insect programs. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 146:66-78.
- R Development Core Team. 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Radhakrishnan, P., D. Pérez-Staples, C. W. Weldon, and P. W. Taylor. 2009. Multiple mating and sperm depletion in male Queensland fruit flies: effects on female remating behaviour. *Animal Behaviour* 78:839-846.
- Revadi, S., S. Lebreton, P. Witzgall, G. Anfora, T. Dekker, and P. G. Becher. 2015. Sexual Behavior of *Drosophila suzukii*. *Insects* 6:183-196.
- Robinson, A. S. 2002. Mutations and their use in insect control. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 511:113-132.
- Toledo, J., J. Rull, A. Oropeza, E. Hernández, and P. Liedo. 2004. Irradiation of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) revisited: optimizing sterility induction. *Journal of Economic Entomology* 97:383-389.

Vreysen, M. 2005. Monitoring sterile and wild insects in area-wide integrated pest management programmes. Pages 325-361 *Sterile Insect Technique*. Springer.

Walsh, D. B., M. P. Bolda, R. E. Goodhue, A. J. Dreves, J. Lee, D. J. Bruck, V. M. Walton, S. D. O'Neal, and F. G. Zalom. 2011. *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): invasive pest of ripening soft fruit expanding its geographic range and damage potential. *Journal of Integrated Pest Management* 2:G1-G7.

Figures

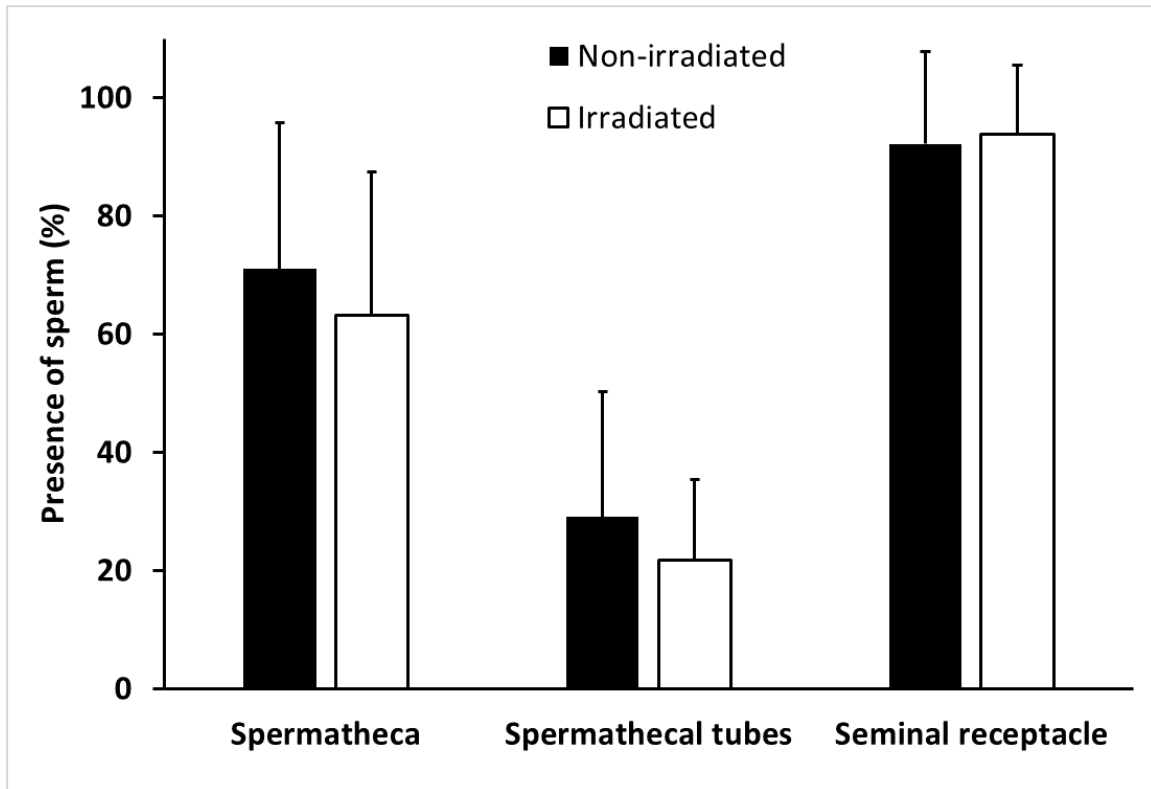


Figure 6: Effect of gamma irradiation at the pupal stage with dose of 120 Gy of males *Drosophila suzukii* on sperm storage in females' reproductive organs. No significant difference according to a binomial linear model.

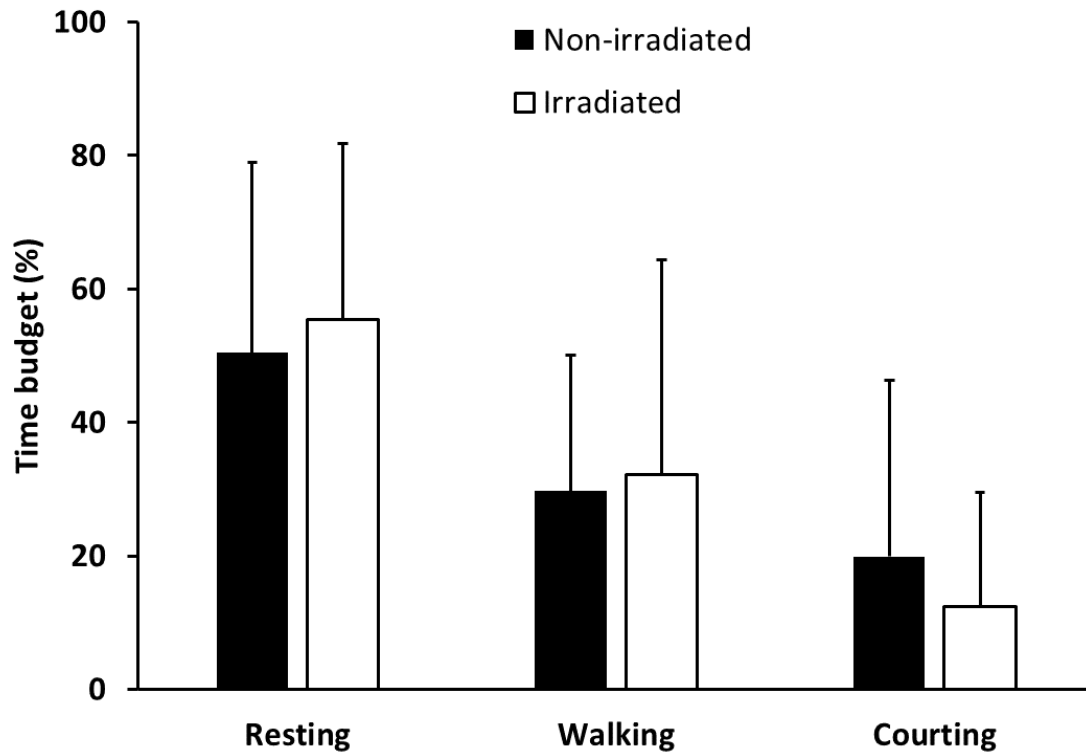


Figure 7: Effect of gamma irradiation at the pupal stage with dose of 120 Gy of males *Drosophila sukikii* time budget when irradiated males were in competition with non-irradiated males. No significant difference according to Kruskal-Wallis tests.

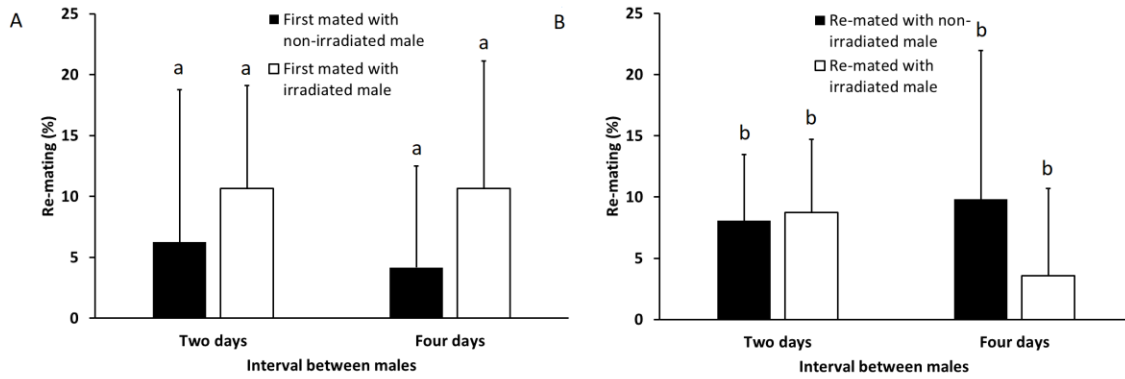


Figure 8: Effect of gamma irradiation at the pupal stage with dose of 120 Gy on *Drosophila suzukii* female re-mating percentage A) if her first mate was irradiated or non-irradiated B) if the second male presented to her was irradiated or non-irradiated. No significant difference according to binomial linear models.

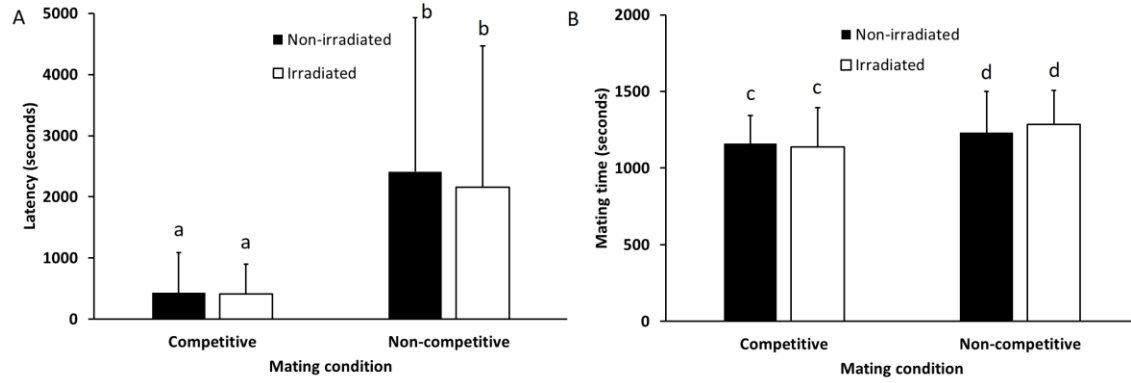


Figure 9: Effect of gamma irradiation at the pupal stage with dose of 120 Gy of *Drosophila suzukii* males on mating properties A) Latency B) Mating duration. Significance was measured with ANOVA, same letters do not differ according to $P < 0.05$.

Conclusions

L'objectif de cette étude consistait à examiner le potentiel de la technique d'insectes stériles comme partie intégrante d'une solution à la problématique de la drosophile à ailes tachetées au Québec. Plus précisément, l'objectif se divisait en deux sections soit (1) quantifier les effets de huit doses d'irradiation gamma sur certains paramètres biologiques des mâles, cela afin d'identifier la dose idéale d'irradiation pour *D. sukii*, et (2) comparer en laboratoire les capacités d'accouplement des mâles irradiés à la dose choisie avec celles des mâles non-irradiés dans des conditions où les mâles étaient en compétition ou non. Ces deux objectifs regroupaient sept prédictions sur lesquelles nous allons revenir.

- 1- *Les taux de mortalité à l'émergence, de malformation et la longévité des adultes mâles et femelles D. sukii ne seront pas affectés significativement par l'irradiation à la dose stérilisant mâles et femelles.*

La première prédiction a été confirmée. Nous n'avons pas observé d'effets négatifs de l'irradiation sur ces paramètres (Figures 1 et 2), possiblement grâce au fait que les irradiations ont eu lieu sur les pupes le plus âgées possible (Lance et McInnis 2005), soit de 12 à 24 h avant leur émergence.

- 2- *La fécondité des femelles D. sukii non-irradiées ne diffèrera pas selon qu'elles soient accouplées à un mâle témoin ou à un mâle irradié, peu importe la dose.*

Nos résultats démontrent effectivement que les femelles pondent autant d'œufs qu'elles soient accouplées à des mâles irradiés ou à des mâles non-irradiés (Figure 3).

3- *La stérilité des mâles et des femelles D. sukukii augmente avec la dose d'irradiation, et que la dose de 70 gy appliquée à des pupes âgées de quatre jours induira la stérilité optimale.*

Le premier énoncé de cette prédiction s'avère vrai, la stérilité augmente avec la dose d'irradiation (Figures 4 et 5). Cependant, la dose d'irradiation nécessaire pour stériliser *D. sukukii* s'est relevée être plus élevée que ce que celle anticipée. Notre prédiction initiale se basait sur l'étude de Follett et al. (2014) où *D. sukukii* fut irradié dans un contexte de quarantaine, les mâles et les femelles irradiés s'accouplant ensemble. En accouplant les individus irradiés à des individus non-irradiés de sexe opposé, nous avons observé que la stérilisation des mâles et des femelles requière des doses d'irradiation différentes.

4- *Les femelles D. sukukii sont plus sensibles à l'irradiation que les mâles : la dose d'irradiation nécessaire pour stériliser les femelles est donc plus faible que celle nécessaire pour stériliser les mâles.*

Cette prédiction a été validée. Une dose de 50 gy stérilise les femelles *D. sukukii* (Figure 3) alors que l'on doit augmenter la dose à 120 Gy pour stériliser les mâles (Figures 4 et 5).

5- *Les capacités d'accouplement des mâles D. sukukii irradiés en situation sans compétition sont similaires à celles des mâles témoins.*

Cette prédiction a aussi été validée. Les mâles irradiés se sont accouplés en moyenne avec $6,4 \pm 1,9$ femelles durant une période de 24 h sans compétition, alors que les mâles non-irradiés se sont accouplés avec $6,9 \pm 2,0$ femelles. De plus, le sperme des mâles irradiés et des mâles non-irradiés se retrouve en proportion équivalente dans les organes de stockage des femelles après un accouplement avec un type de mâle ou l'autre (Figure 6).

6- *Les capacités d'accouplement en situation de compétition des mâles D. sukukii irradiés sont similaires à celles des mâles témoins.*

Cette prédiction s'avère aussi juste, malgré l'observation d'une tendance non-significative (les mâles irradiés et non-irradiés ont accouplé respectivement 37,5% et 62,5% des femelles) en faveur du mâle non-irradié. L'étude du budget de temps des mâles quant aux activités de repos, de mouvement et de séduction lors de l'expérience de compétitivité n'a pas non plus démontrée de différences entre les mâles irradiés et les mâles non-irradiés (Figure 7).

7- *Le statut du mâle lors d'un premier accouplement, témoin vs irradié, n'influence pas la probabilité qu'une femelle s'accouple de nouveau.*

Cette dernière prédiction a également été validée. Nous avons observé un faible taux de ré-accouplement des femelles lors de présentation d'un second et troisième mâle deux et quatre jours après le premier accouplement. Les ré-accouplements n'étaient pas influencés par la nature (irradié ou non) du premier ou du second mâle ou par la durée du premier accouplement (Figure 8).

Ces résultats sont originaux et s'inscrivent dans le cadre d'une première tentative d'adaptation de la TIS à *D. sukukii*.

Pour répondre au premier objectif de l'étude, soit d'identifier la dose idéale d'irradiation pour un programme de TIS avec *D. sukukii*, nous suggérons la dose de 120 Gy car celle-ci permet de réduire à 4,0% l'éclosion des œufs et à 0,2% la survie de la descendance jusqu'au stade adulte, sans affecter l'émergence, le taux de malformation ni la longévité des adultes. Cependant, afin de valider cette dose, diverses autres avenues de recherche devraient être suivies, en particulier à cause de la tendance en faveur des mâles non-irradiés observée en compétitivité. Il pourrait

être nécessaire de réduire la dose d'irradiation ou de trouver une autre manière de rendre les mâles irradiés plus compétitifs pour l'accouplement des femelles sauvages, par exemple en augmentant leur taille. La mise en place d'un programme de TIS contre une nouvelle espèce exige plusieurs types d'expériences, non seulement effectuées en laboratoire, mais aussi en conditions semi-terrain, sur le terrain et une optimisation des paramètres économiques d'une telle approche (Tableau 2). C'est en réalisant ces expériences et en analysant leurs résultats que la dose idéale d'irradiation pour *D. sukii* pourra être confirmée ou modifiée.

Tableau 2 : Les expériences à effectuer lors de l'adaptation de la technique des insectes stériles à une nouvelle espèce

Expériences de laboratoire :	Effectuée
• Stérilité associée à différentes doses d'irradiation	X
• Stérilité induite à la F1	X
• Test d'émergence et de malformation	X
• Longévité	X
• Capacité de vol	
• Connaissance du comportement reproductif de l'espèce	X
• Capacité d'accouplement en absence de compétition	X
• Compétitivité des mâles irradiés	X
• Ré-accouplement des femelles	X
• Compétitivité spermatique lors d'accouplement multiple	
• Tester l'irradiation en hypoxie	
• Essayer de produire des mâles de plus grande taille	
Expériences de semi-terrain :	
• Indice de compétitivité de Fried	
• Compatibilité entre la population stérile et la population sauvage	
• Tester différents ratios de mâles stériles : mâles sauvages	
Expériences de terrain :	
• Quantité d'insectes à lâcher selon les champs	
• Dispersion des insectes stériles	
• Études des dommages	

Optimisation financière :

- Amélioration de la diète
- Méthode d'élevage de masse
- Séparation des sexes
- Possibilité de réduire la dose d'irradiation pour réduire les coûts
- Contrôle de qualité de la production
- Commercialisation de la TIS

Par exemple, Fried (1971) a développé un indice de compétitivité des mâles irradiés à différentes doses afin d'évaluer si une dose d'irradiation doit être réduite ou non. L'indice de compétitivité de Fried (C) se mesure grâce à l'équation $C = ((H_n - H_o)/(H_o - H_s) * (N/S))$ où H_n et H_s représentent le taux d'éclosion des œufs lorsque des femelles sont respectivement accouplées à des mâles non-irradiés et irradiés. H_o représente le taux d'éclosion des œufs observé, N le nombre de mâles non-irradiés et S le nombre de mâles irradiés (Fried 1971). Cet indice permet de quantifier la proportion d'œufs stériles pondus dans une population sauvage lorsqu'on y introduit des mâles irradiés à différentes doses. La dose d'irradiation reliée à l'indice de Fried le plus élevé est celle qui permettra une plus grande réduction de la population et est donc la plus efficace.

L'aspect de l'accouplement multiple chez la femelle *D. sukii* et de la compétition spermatique lors d'accouplement multiple reste à approfondir. Nous avons observé que celui-ci se produisait à faible taux dans les quatre jours suivants le premier accouplement. Cependant les cas d'accouplement multiple existent, alors il serait très intéressant chez des femelles accouplées avec mâles irradiés et des mâles non-irradiés de pouvoir étudier le taux d'éclosion des œufs pondus. Cette étude permettrait de répondre aux questions suivantes : est-ce que le premier ou le second mâle utilise une stratégie favorisant l'utilisation de son sperme, par exemple en enlevant le sperme déjà présent dans la femelle lors de l'accouplement comme le fait *D.*

ananassae (Singh et Singh 2001)? Puisque le succès de fécondation d'un mâle en situation de compétition spermatique dépend en partie de la qualité de son sperme (Pattarini et al. 2006), est-ce que le sperme des mâles irradiés subit une perte de qualité et donc de compétitivité? Ou bien est-ce que la femelle utilise de manière aléatoire le sperme des deux mâles comme observé pour *D. melanogaster* (Meyer et Meyer 1961)? La quantité d'œufs produits avec le sperme non fertile influence significativement l'efficacité réelle d'une TIS, car représente la diminution de la population.

Par la suite, une étude de compatibilité d'accouplement entre la population de laboratoire et la population sauvage peut être nécessaire, en particulier si les individus irradiés ne proviennent pas de la même population que celle faisant l'objet d'un programme de TIS. Elle permettra de déterminer s'il existe une différenciation comportementale entre les populations, comme par exemple la période ou le lieu de l'accouplement, possiblement due à l'élevage intensif en laboratoire (Boller 1972, Ito et Yamamura 2005). De plus, au lieu de comparer les mâles irradiés à des mâles de laboratoire d'une même population, le test de compatibilité compare les mâles irradiés aux mâles sauvages qui peuvent différer en taille. Tester différents ratios de mâles stériles : mâles sauvages permettra d'observer l'efficacité de la méthode à réduire une population et choisir celui à utiliser selon les résultats désirés. Des lâchers sur le terrain et une étude des dommages permettront de confirmer l'efficacité de la TIS avec ce ravageur.

Ensuite, la recherche devrait aborder les aspects économiques de la TIS, soit la réduction des coûts de production et d'utilisation des insectes stériles (Parker 2005). L'espace de travail, la diète et la main d'œuvre doivent être optimisés, et une étude de coûts/bénéfices réalisée (Mumford 2005), afin de savoir si un traitement par la TIS contre *D. sukuzii* serait rentable. Le développement d'une technique de séparation des sexes permettrait de produire seulement

des mâles, ce qui réduirait les coûts de production et augmenterait l'efficacité des lâchers. En effet, la production de femelles stériles peut limiter la dispersion des mâles, car des mâles en présence de femelles ont tendance à rester sur place pour s'accoupler avec celles-ci, réduisant par le fait même le nombre accouplements avec des femelles sauvages (Hendrichs et al. 1995).

Finalement, nous croyons que la TIS possède plusieurs avantages comme le fait d'être respectueuse de l'environnement, de ne pas affecter les espèces non-cibles et de ne pas entraîner un développement de résistance chez le ravageur, ce qui en fait une solution très intéressante pour le futur. Plusieurs avenues de recherche doivent être suivies avant de pouvoir l'appliquer de manière commerciale contre *D. suzukii*, mais cela pourrait être une solution à ce ravageur causant des dommages à une échelle internationale.

Bibliographie

- Abraham, S., M. Liendo, F. Devescovi, P. Peralta, V. Yusef, J. Ruiz, J. Cladera, M. Vera, et D. Segura. 2013. Remating behavior in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) females is affected by male juvenile hormone analog treatment but not by male sterilization. *Bulletin of Entomological Research* 103:310-317.
- Adrion, J. R., A. Kousathanas, M. Pascual, H. J. Burrack, N. M. Haddad, A. O. Bergland, H. Machado, T. B. Sackton, T. A. Schlenke, et M. Watada. 2014. *Drosophila suzukii*: The genetic footprint of a recent, worldwide invasion. *Molecular Biology and Evolution* 31:3148-3163.
- Agence canadienne d'inspection des aliments. 2011. *Drosophila suzukii* (Drosophile à ailes tachetées). <http://www.inspection.gc.ca/vegetaux/protection-des-vegetaux/directives/gestion-du-risque/dgr-11-01/fra/1330738873775/1330738972893>, Accessed: 9/02/2015.
- Agri-réseau. 2013. La drosophile à ailes tachetées: nouvelle réalité québécoise. https://www.agrireseau.net/lab/documents/Drosophile%20%C3%A0%20ailes%20tachet%C3%A9es_2013.pdf, Accessed: 23/03/2017.
- Allinghi, A., C. Gramajo, E. Willink, et J. Vilardi. 2007. Induction of sterility in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) by gamma radiation. *Florida Entomologist* 90:96-102.
- Amersekere, R., et G. Georghiou. 1971. Sterilization of the beet leafhopper: induction of sterility and evaluation of biotic effects with a model sterilant (OM-53139) and ⁶⁰Co irradiation. *Journal of Economic Entomology* 64:1074-1080.
- Amoako-Atta, B., et G. Partida. 1976. Sensitivity of almond moth pupae to gamma radiation (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 49:133-140.
- Andreasen, M., et C. Curtis. 2005. Optimal life stage for radiation sterilization of *Anopheles* males and their fitness for release. *Medical and Veterinary Entomology* 19:238-244.

- Arthur, V., J. Aguilar, F. Wiendl, et T. Wiendl. 2002. The use of gamma radiation to control two serious pests of Brazilian agriculture. Final research co-ordination meeting on evaluation of *Lepidoptera* population suppression by radiation induced sterility. Agence internationale de l'énergie atomique, Penang, Malaysia.
- Bakri, A., K. Mehta, et D. Lance. 2005. Sterilizing insects with ionizing radiation. Pages 233-268 in V. Dyck, J. Hendrichs, et A. Robinson, editors. Sterile Insect Technique. Springer, Pays-Bas.
- Batiste, W. C., W. H. Olson, et A. Berlowitz. 1973. Codling moth: Influence of temperature and daylight intensity on periodicity of daily flight in the field. *Journal of Economic Entomology* 66:883-892.
- Beers, E. H., R. A. Van Steenwyk, P. W. Shearer, W. W. Coates, et J. A. Grant. 2011. Developing *Drosophila suzukii* management programs for sweet cherry in the western United States. *Pest Management Science* 67:1386-1395.
- Birkhead, T. R., et A. P. Møller. 1998. Sperm competition and sexual selection. Academic Press, États-Unis.
- Bloem, S., J. Carpenter, A. McCluskey, R. Fugger, S. Arthur, et S. Wood. 2007. Suppression of the codling moth *Cydia pomonella* in British Columbia, Canada using an area-wide integrated approach with an SIT components. Pages 591-601 *Area-Wide Control of Insect Pests*. Springer.
- Bolda, M. P., R. E. Goodhue, et F. G. Zalom. 2010. Spotted wing drosophila: potential economic impact of a newly established pest. *Agricultural and Resources Economics Update*, University of California, Giannini Foundation. 13:5-8.
- Boller, E. 1972. Behavioral aspects of mass-rearing of insects. *Entomophaga* 17:9-25.
- Brower, J. H. 1975. Gamma Irradiation of Adult *Plodia interpunctella*: Effects on Mating, Sterility, and Number of Progeny. *Annals of the Entomological Society of America* 68:1086-1090.

- Brown, P., P. Shearer, J. Miller, et H. Thistlewood. 2011. The discovery and rearing of a parasitoid (Hymenoptera: Pteromalidae) associated with spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii*. Pages 13-16 in Oregon and British Columbia. ESA 59th Annual Meeting.
- Bruck, D. J., M. Bolda, L. Tanigoshi, J. Klick, J. Kleiber, J. DeFrancesco, B. Gerdeman, et H. Spitler. 2011. Laboratory and field comparisons of insecticides to reduce infestation of *Drosophila suzukii* in berry crops. *Pest management science* 67:1375-1385.
- Calvitti, M., P. Remotti, U. Cirio, et K.-H. Tan. 2000. The sterile insect technique in the integrated pest management of whitefly species in greenhouses. Pages 185-192 in Area-wide control of fruit flies and other insect pests. Joint proceedings of the international conference on area-wide control of insect pests, 28 May-2 June, 1998 and the Fifth International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, Penang, Malaysia, 1-5 June, 1998. Penerbit Universiti Sains Malaysia.
- Carde, R. T. 1990. Principles of mating disruption. *Behavior-Modifying Chemicals for Pest Management: Applications of Pheromones and Other Attractants*. Marcel Dekker, New York:47-71.
- Cartier, L. 2015. Economic Benefits of Using Sterile Insect Technique and Mating Disruption to Control Codling Moth. *International Journal of Biology* 7:14.
- Cini, A., C. Ioriatti, et G. Anfora. 2012. A review of the invasion of *Drosophila suzukii* in Europe and a draft research agenda for integrated pest management. *Bulletin of Insectology* 65:149-160.
- Cogburn, R. R., E. W. Tilton, et J. H. Brower. 1973. Almond moth: gamma radiation effects on the life stages. *Journal of Economic Entomology* 66:745-751.
- Copping, L. G., et J. J. Menn. 2000. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science* 56:651-676.

- Cormier, D., J. Veilleux, et A. Firlej. 2015. Exclusion net to control spotted wing *Drosophila* in blueberry fields. *IOBC-WPRS Bull* 109:181-184.
- Cossentine, J., M. Robertson, et R. Buitenhuis. 2016. Impact of acquired entomopathogenic fungi on adult *Drosophila suzukii* survival and fecundity. *Biological Control* 103:129-137.
- Cuthbertson, A. G., et N. Audsley. 2016. Further Screening of Entomopathogenic Fungi and Nematodes as Control Agents for *Drosophila suzukii*. *Insects* 7:24.
- Cuthbertson, A. G., D. A. Collins, L. F. Blackburn, N. Audsley, et H. A. Bell. 2014. Preliminary screening of potential control products against *Drosophila suzukii*. *Insects* 5:488-498.
- Dalton, D. T., V. M. Walton, P. W. Shearer, D. B. Walsh, J. Caprile, et R. Isaacs. 2011. Laboratory survival of *Drosophila suzukii* under simulated winter conditions of the Pacific Northwest and seasonal field trapping in five primary regions of small and stone fruit production in the United States. *Pest Management Science* 67:1368-1374.
- Deprá, M., J. L. Poppe, H. J. Schmitz, D. C. De Toni, et V. L. Valente. 2014. The first records of the invasive pest *Drosophila suzukii* in the South American continent. *Journal of Pest Science* 87:379-383.
- Devine, G. J., et M. J. Furlong. 2007. Insecticide use: contexts and ecological consequences. *Agriculture and Human Values* 24:281-306.
- Dukes, J. S., J. Pontius, D. Orwig, J. R. Garnas, V. L. Rodgers, N. Brazeel, B. Cooke, K. A. Theoharides, E. E. Stange, et R. Harrington. 2009. Responses of insect pests, pathogens, and invasive plant species to climate change in the forests of northeastern North America: What can we predict? This article is one of a selection of papers from NE Forests 2100: A Synthesis of Climate Change Impacts on Forests of the Northeastern US and Eastern Canada. *Canadian Journal of Forest Research* 39:231-248.

- Economopoulos, A. 1977. Gamma-ray sterilization of *Dacus oleae* (Gmelin) Effect of nitrogen on the competitiveness of irradiated males. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* 83:86-95.
- Emiljanowicz, L. 2014. Life History and Overwintering Survival of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada.
- Farnsworth, D., K. Hamby, M. Bolda, R. Goodhue, J. Williams, et F. Zalom. 2016. Economic analysis of revenue losses and control costs associated with the spotted wing drosophila (*Drosophila suzukii* (Matsumura)) in the California raspberry industry. *Pest Management Science*.
- Follett, P. A., A. Swedman, et D. K. Price. 2014. Postharvest Irradiation Treatment for Quarantine Control of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in Fresh Commodities. *Journal of Economic Entomology* 107:964-969.
- Fournier, F., et L. Brodeur. 2007. Contrôle biologique de la mouche de l'oignon (*Delia antiqua*) dans la production d'oignons à l'aide de lâchers d'insectes stériles produits en insectaire. Phytodata Inc., Sherrington, Québec.
- Fournier, F., et L. Brodeur. 2009. Amélioration de la méthode d'élevage et d'entreposage à long terme de la mouche de l'oignon (*Delia antiqua*) et validation de l'efficacité des lâchers inondatifs de mâles stériles au champ. Phytodata Inc., Sherrington, Québec.
- Fournier, F., et L. Brodeur. 2012. Optimisation de la stratégie de lâchers inondatifs d'insectes stériles pour le contrôle biologique de la mouche de l'oignon (*Delia antiqua*). Phytodata Inc., Sherrington, Québec.
- Franz, G., et A. S. Robinson. 2011. Molecular technologies to improve the effectiveness of the sterile insect technique. *Genetica* 139:1-5.
- Fried, M. 1971. Determination of sterile-insect competitiveness. *Journal of Economic Entomology* 64:869-872.

- Fuyama, Y. 1979. A visual stimulus in the courtship of *Drosophila suzukii*. *Experientia* 35:1327-1328.
- Geier, P. 1966. Management of insect pests. *Annual Review of Entomology* 11:471-490.
- Gilchrist, A., et L. Partridge. 1995. Male identity and sperm displacement in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* 41:1087-1092.
- Goodhue, R. E., M. Bolda, D. Farnsworth, J. C. Williams, et F. G. Zalom. 2011. Spotted wing drosophila infestation of California strawberries and raspberries: economic analysis of potential revenue losses and control costs. *Pest Management Science* 67:1396-1402.
- Hauser, M. 2011. A historic account of the invasion of *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae) in the continental United States, with remarks on their identification. *Pest Management Science* 67:1352-1357.
- Helinski, M., A. G. Parker, et B. G. Knols. 2009. Radiation biology of mosquitoes. *Malaria Journal* 8:S6.
- Hendrichs, J., G. Franz, et P. Rendon. 1995. Increased effectiveness and applicability of the sterile insect technique through male-only releases for control of Mediterranean fruit flies during fruiting seasons. *Journal of Applied Entomology* 119:371-377.
- Hendrichs, J., A. Robinson, J. Cayol, et W. Enkerlin. 2002. Medfly areawide sterile insect technique programmes for prevention, suppression or eradication: the importance of mating behavior studies. *Florida Entomologist* 85:1-13.
- Hendrichs, J., M. Vreysen, W. Enkerlin, et J. Cayol. 2005. Strategic options in using sterile insects for area-wide integrated pest management. Pages 563-600 in V. Dyck, J. Hendrichs, et A. Robinson, editors. *Sterile Insect Technique*. Springer, Pays-Bas.
- Hulme, P. E. 2009. Trade, transport and trouble: managing invasive species pathways in an era of globalization. *Journal of Applied Ecology* 46:10-18.

- Hunter, F., et T. Birkhead. 2002. Sperm viability and sperm competition in insects. *Current Biology* 12:121-123.
- Hurtado, J., et E. Hasson. 2013. Inter and intraspecific variation in female remating propensity in the cactophilic sibling species *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae*. *Journal of Insect Physiology* 59:569-576.
- Ito, Y., et K. Yamamura. 2005. Role of population and behavioural ecology in the sterile insect technique. Pages 177-208 in V. Dyck, J. Hendrichs, et A. Robinson, editors. *Sterile Insect Technique*. Springer, Pays-Bas.
- Judd, G. J., H. Thistlewood, M. G. Gardiner, et B. L. Lannard. 2006. Is lack of mating competitiveness in spring linked to mating asynchrony between wild and mass-reared codling moths from an operational sterile insect programme? *Entomologia Experimentalis et Applicata* 120:113-124.
- Kakinohana, H., H. Kuba, M. Yamagishi, T. Kohama, K. Kinjyo, A. Tanahara, Y. Sokei, et S. Kiriara. 1993. The eradication of the melon fly from the Okinawa Islands, Japan: II. Current control program. Pages 465-469 *Fruit Flies*. Springer, États-Unis.
- Kaneshiro, K. 1983. *Drosophila* (Sophophora) *suzukii* (Matsumura). *Proc Hawaiian Entomol Soc* 24:179.
- Kaspi, R., et M. P. Parrella. 2003. The feasibility of using the sterile insect technique against *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) infesting greenhouse chrysanthemum. *Annals of Applied Biology* 143:25-34.
- Kawase, S., K. Uchino, M. Yasuda, et S. Motoori. 2008. Netting control of cherry drosophila *Drosophila suzukii* injurious to blueberry [Vaccinium]. *Bulletin of the Chiba Prefectural Agriculture Research Center (Japan)*.

- Kimura, M. T. 2004. Cold and heat tolerance of drosophilid flies with reference to their latitudinal distributions. *Oecologia* 140:442-449.
- Klassen, W. 2005. Area-wide integrated pest management and the sterile insect technique. Pages 39-68 *in* V. Dyck, J. Hendrichs, et A. Robinson, editors. *Sterile Insect Technique*. Springer, Pays-Bas.
- Klassen, W., et C. Curtis. 2005. History of the sterile insect technique. Pages 3-36 *in* V. Dyck, J. Hendrichs, et A. Robinson, editors. *Sterile Insect Technique*. Springer, Pays-Bas.
- Knipling, E. F. 1992. Principles of insect parasitism analyzed from new perspectives. Practical implications for regulating insect populations by biological means. *Agriculture Handbook*, United States Department of Agriculture, United States.
- Lambert, L., N. Roullé, et R. Bindea. 2014. La drosophile à ailes tachetées attaque nos petits fruits. <http://www.lutteintegree.com/IMG/pdf/drosophile.a.ailes.tachetees.drosophila.suzukii-4.pdf>, Accessed 12/03/2015.
- Lance, D., et D. McInnis. 2005. Biological basis of the sterile insect technique. Pages 69-94 *in* V. Dyck, J. Hendrichs, et A. Robinson, editors. *Sterile Insect Technique*. Springer, Pays-Bas.
- Lee, J. C., D. J. Bruck, H. Curry, D. Edwards, D. R. Haviland, R. A. Van Steenwyk, et B. M. Yorgey. 2011. The susceptibility of small fruits and cherries to the spotted-wing drosophila, *Drosophila suzukii*. *Pest Management Science* 67:1358-1367.
- Loosjes, M., et K.-H. Tan. 2000. The sterile insect technique for commercial control of the onion fly. Pages 181-184 *in* Area-wide control of fruit flies and other insect pests. Joint proceedings of the international conference on area-wide control of insect pests, 28 May-2 June, 1998 and the Fifth International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, Penang, Malaysia, 1-5 June, 1998. Penerbit Universiti Sains Malaysia.

- Lüning, K. 1952. X-ray induced dominant lethals in different stages of spermatogenesis in *Drosophila*. *Hereditas* 38:91-107.
- Lux, S., J. Vilardi, P. Liedo, K. Gaggli, G. Calcagno, F. Munyiri, M. Vera, et F. Manso. 2002. Effects of irradiation on the courtship behavior of medfly (Diptera, Tephritidae) mass reared for the sterile insect technique. *Florida Entomologist* 85:102-112.
- Markow, T. 1996. Evolution of *Drosophila* mating systems. *Evolutionary Biology* 29:73-106.
- Mazzi, D., et S. Dorn. 2012. Movement of insect pests in agricultural landscapes. *Annals of Applied Biology* 160:97-113.
- Mazzoni, V., G. Anfora, et M. Virant-Doberlet. 2013. Substrate vibrations during courtship in three *Drosophila* species. *PLoS One* 8:e80708.
- Meyer, H., et E. Meyer. 1961. Sperm utilization from successive copulations in females of *Drosophila melanogaster*. *Dros. Inf. Serv* 35:90-92.
- Miller, R. R., J. D. Williams, et J. E. Williams. 1989. Extinctions of North American fishes during the past century. *Fisheries* 14:22-38.
- Mitsui, H., K. Beppu, et M. T. Kimura. 2010. Seasonal life cycles and resource uses of flower- and fruit-feeding drosophilid flies (Diptera: Drosophilidae) in central Japan. *Entomological Science* 13:60-67.
- Miyatake, T. 2006. Quantitative genetic aspects of the quality control of mass-reared insects: the case of the melon fly (*Bactrocera cucurbitae*). *Formosan Entomologist* 26:307-318.
- Moriya, S., et T. Miyatake. 2001. Eradication programs of two sweetpotato pests, *Cylas formicarius* and *Eusepes postfasciatus*, in Japan with special reference to their dispersal ability. *Japan Agricultural Research Quarterly* 35:227-234.
- Mumford, J. 2005. Application of benefit/cost analysis to insect pest control using the sterile insect technique. Pages 481-498 *Sterile Insect Technique*. Springer.

- Ogaugwu, C. E. 2014. Towards area-wide control of *Bactrocera invadens*: prospects of the sterile insect technique and molecular entomology. *Pest Management Science* 70:524-527.
- Oliva, C. F., M. Jacquet, J. Gilles, G. Lemperiere, P. O. Maquart, S. Quilici, F. Schooneman, M. J. Vreysen, et S. Boyer. 2012. The sterile insect technique for controlling populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) on Reunion Island: mating vigour of sterilized males. *PLoS One* 7:e49414.
- Parker, A. 2005. Mass-rearing for sterile insect release. Pages 209-232 in V. Dyck, J. Hendrichs, et A. Robinson, editors. *Sterile Insect Technique*. Springer, Pays-Bas.
- Parker, A., et K. Mehta. 2007. Sterile Insect Technique: A model for dose optimization for improved sterile insect quality. *Florida Entomologist* 90:88-95.
- Parker, G. A. 1970. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biological Reviews* 45:525-567.
- Pattarini, J. M., W. T. Starmer, A. Bjork, et S. Pitnick. 2006. Mechanisms underlying the sperm quality advantage in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 60:2064-2080.
- Pereira, R., B. Yuval, P. Liedo, P. E. A. Teal, T. E. Shelly, D. O. McInnis, et J. Hendrichs. 2013. Improving sterile male performance in support of programmes integrating the sterile insect technique against fruit flies. *Journal of Applied Entomology* 137:178-190.
- Pérez-Staples, D., T. E. Shelly, et B. Yuval. 2013. Female mating failure and the failure of 'mating' in sterile insect programs. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 146:66-78.
- Pimentel, D., et H. Lehman. 1993. *The pesticide question: environment, economics, and ethics*. Springer Science & Business Media, États-Unis.
- Prisme Consortium. 2016. Bio-Usine de mouches stériles. <https://prisme.ca/recherche-et-developpement/elevage-et-lacher-de-mouches-steriles/>, Accessed: 3/04/2017.

- Programa Moscamed Guatemala. 2016. Control. http://moscamed-guatemala.org.gt/?page_id=749, Accessed 16/02/2016.
- Prout, T. 1978. The joint effects of the release of sterile males and immigration of fertilized females on a density regulated population. *Theoretical Population Biology* 13:40-71.
- Proverbs, M., et J. Newton. 1962. Influence of gamma radiation on the development and fertility of the codling moth, *Carpocapsa pomonella* (L.) (Lepidoptera: Olethreutidae). *Canadian Journal of Zoology* 40:401-420.
- Renkema, J., M. Miller, H. Fraser, J. Légaré, et R. Hallett. 2013. First records of *Zaprionus indianus* Gupta (Diptera: Drosophilidae) from commercial fruit fields in Ontario and Quebec, Canada. *Journal of the Entomological Society of Ontario* 144:125-130.
- Renkema, J. M., Z. Telfer, T. Garipey, et R. H. Hallett. 2015. *Dalotia coriaria* as a predator of *Drosophila suzukii*: Functional responses, reduced fruit infestation and molecular diagnostics. *Biological Control* 89:1-10.
- Revadi, S., S. Lebreton, P. Witzgall, G. Anfora, T. Dekker, et P. G. Becher. 2015. Sexual Behavior of *Drosophila suzukii*. *Insects* 6:183-196.
- Robinson, A. 2005. Genetic basis of the sterile insect technique. Pages 95-114 in V. Dyck, J. Hendrichs, et A. Robinson, editors. *Sterile Insect Technique*. Springer, Pays-Bas.
- Robinson, A., et J. Hendrichs. 2005. Prospects for the future development and application of the sterile insect technique. Pages 727-760 in V. Dyck, J. Hendrichs, et A. Robinson, editors. *Sterile Insect Technique*. Springer, Pays-Bas.
- Singh, B. N., et S. R. Singh. 2001. Female remating in *Drosophila ananassae*: Evidence for sperm displacement and greater productivity after remating. *Zoological Science* 18:181-185.

- Smith, R. F., J. L. Apple, et D. G. Bottrell. 1976. The origins of integrated pest management concepts for agricultural crops. Pages 1-16 Integrated pest management. Springer, États-Unis.
- Smith, R. L. 2012. Sperm competition and the evolution of animal mating systems. Elsevier, États-Unis.
- Stattersfield, A. J., D. R. Capper, G. C. Dutson, et T. Morrisey. 2000. Threatened birds of the world: the official source for birds on the IUCN red list. BirdLife International Cambridge, Grande-Bretagne.
- Stenersen, J. 2004. Chemical pesticides mode of action and toxicology. CRC press, États-Unis.
- Stern, V. M., R. F. Smith, R. Van den Bosch, et K. S. Hagen. 1959. The integration of chemical and biological control of the spotted alfalfa aphid. The integrated control concept. *Hilgardia* 29:81-101.
- Suckling, D. M., L. D. Stringer, A. E. Stephens, B. Woods, D. G. Williams, G. Baker, et A. M. El-Sayed. 2013. From integrated pest management to integrated pest eradication: technologies and future needs. *Pest Management Science* 70:179-189.
- Takken, V., M. Oladunmade, L. Dengwat, H. Feldmann, J. Onah, S. Tenabe, et H. Hamann. 1986. The eradication of *Glossina palpalis palpalis* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Glossinidae) using traps, insecticide-impregnated targets and the sterile insect technique in central Nigeria. *Bulletin of Entomological Research* 76:275-286.
- Teal, P., Y. Gomez-Simuta, B. Dueben, T. Holler, et S. Olson. 2007. Improving the efficacy of the sterile insect technique for fruit flies by incorporation of hormone and dietary supplements into adult holding protocols. Pages 163-173 Area-Wide Control of Insect Pests. Springer, Pays-Bas.

- The World Food Prize. 1992. 1992: Knipling and Bushland.
https://www.worldfoodprize.org/en/laureates/19871999_laureates/1992_knipling_and_bushland/, Accessed: 18/02/2015.
- Tochen, S., D. T. Dalton, N. Wiman, C. Hamm, P. W. Shearer, et V. M. Walton. 2014. Temperature-related development and population parameters for *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) on cherry and blueberry. *Environmental Entomology* 43:501-510.
- Toledo, J., J. Rull, A. Oropeza, E. Hernández, et P. Liedo. 2004. Irradiation of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) revisited: optimizing sterility induction. *Journal of Economic Entomology* 97:383-389.
- Tomaru, M., et H. Yamada. 2011. Courtship of *Drosophila*, with a special interest in courtship songs. *Low Temperature Science* 69:61-85.
- Vreysen, M. J. B. 1995. Radiation induced sterility to control tsetse flies: the effect of ionising radiation and hybridisation on tsetse biology and the use of the sterile insect technique in integrated tsetse control. Université agricole de Wageningen, Wageningen, Pays-Bas.
- Vreysen, M. J. B., J. E. Carpenter, et F. Marec. 2010. Improvement of the sterile insect technique for codling moth *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Lepidoptera Tortricidae) to facilitate expansion of field application. *Journal of Applied Entomology* 134:165-181.
- Walsh, D. B., M. P. Bolda, R. E. Goodhue, A. J. Dreves, J. Lee, D. J. Bruck, V. M. Walton, S. D. O'Neal, et F. G. Zalom. 2011. *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): invasive pest of ripening soft fruit expanding its geographic range and damage potential. *Journal of Integrated Pest Management* 2:G1-G7.
- Weldon, C. W., et P. W. Taylor. 2011. Sexual development of wild and mass-reared male Queensland fruit flies in response to natural food sources. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 139:17-24.

- Williamson, M. 1996. Biological invasions. Springer Science & Business Media, Grande-Bretagne.
- Wolfner, M. F. 1997. Tokens of love: functions and regulation of *Drosophila* male accessory gland products. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27:179-192.
- Woltz, J., K. Donahue, D. Bruck, et J. Lee. 2015. Efficacy of commercially available predators, nematodes and fungal entomopathogens for augmentative control of *Drosophila suzukii*. *Journal of applied entomology* 139:759-770.
- Wyss, J. H., et K.-H. Tan. 2000. Screw-worm eradication in the Americas-overview. Pages 79-86 *in* Area-wide control of fruit flies and other insect pests. Joint proceedings of the international conference on area-wide control of insect pests, 28 May-2 June, 1998 and the Fifth International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, Penang, Malaysia, 1-5 June, 1998. Penerbit Universiti Sains Malaysia.