

Reconstruction des routes d'invasion: nouvelles méthodes génétiques et statistiques appliquées à *Drosophila suzukii*

Antoine Fraimout, Vincent Debat, Simon Fellous, Ruth Hufbauer, Julien Foucaud, Pierre Pudlo, Jean-Michel Marin, Donald K. Price, Julien Cattel, Xiao Chen, Marindia Deprá, Pierre François Duyck, Christelle Guedot, Gregory Loeb, Marc Kenis, Masahito T. Kimura, Isabel Martinez, Marta Pascual, Maxi Polihronakis Richmond, Peter Shearer, Nadia Singh, Koichiro Tamura, Anne Xuéreb, Jinping Zhang, Anne Loiseau, & Arnaud Estoup.

Arnaud Estoup

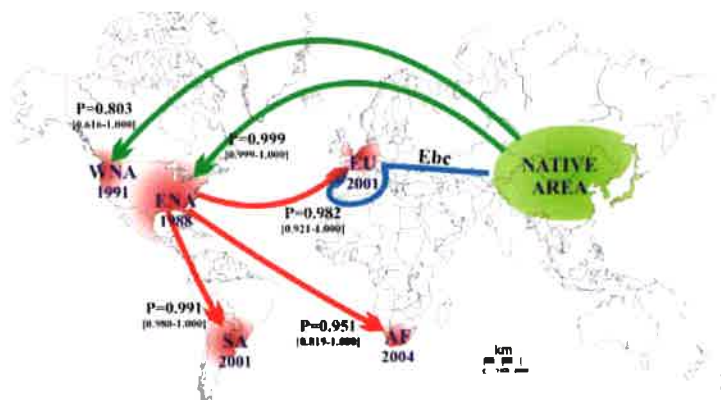
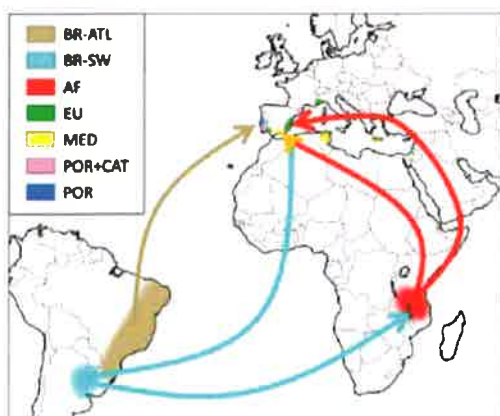
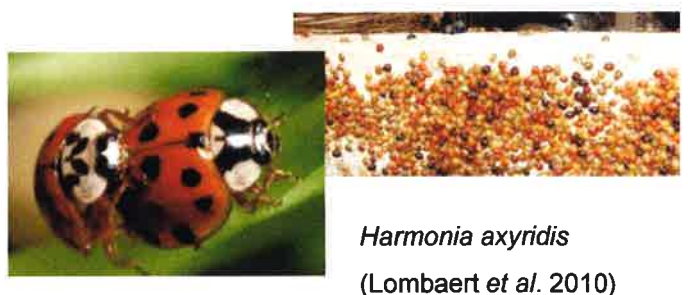
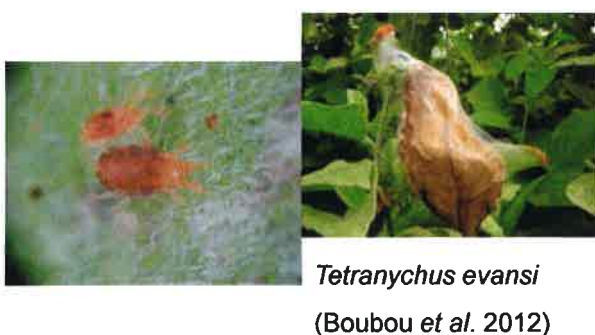
Centre de Biologie pour la Gestion des Populations
(CBGP, INRA, France)

Réunion nationale *Drosophila suzukii*, CTIFL, Balandran, décembre 2016

1

LES ROUTES D'INVASION: « QU'EST CE QUE C'EST? »

Routes d'invasion = histoire géographique et démographique des propagules envahissantes depuis leur sources natives ou invasives



2

Retracer les routes d'invasion

Pourquoi

- Définir et tester des hypothèses relatives aux facteurs environnementaux et évolutifs responsables des invasions biologiques
- Faciliter la mise en place de stratégies de lutte plus efficaces
 - Déterminer les mesures de quarantaine les plus adaptées en fonction des aires d'origine et des moyens de dispersion
 - Choisir des souches/espèces d'agents en vue du contrôle biologique (classiquement même origine géographique que la population/espèce invasive)

3

Retracer les routes d'invasion

Comment

La plus grande partie de nos connaissances est en liée aux observations historiques qui sont souvent incomplètes, et quelques fois trompeuses (d'autant plus que l'organisme concerné est petit et discret).

→ **Utilisation de marqueurs moléculaires + méthodes statistiques adaptées à la complexité des problèmes traités**

4

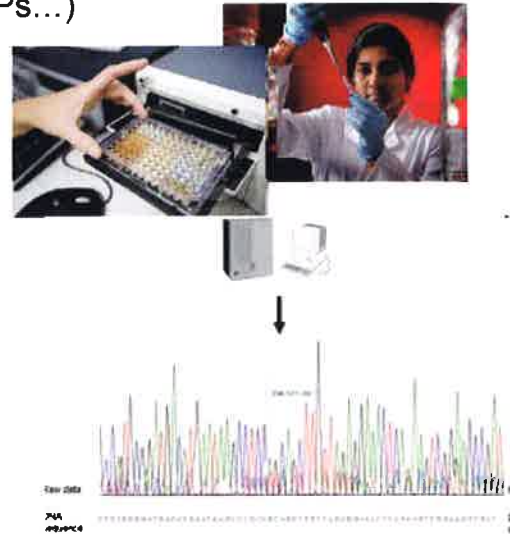
Retracer les routes d'invasion

Echantillonnage



Données moléculaires

(microsatellites, DNA sequences, SNPs...)



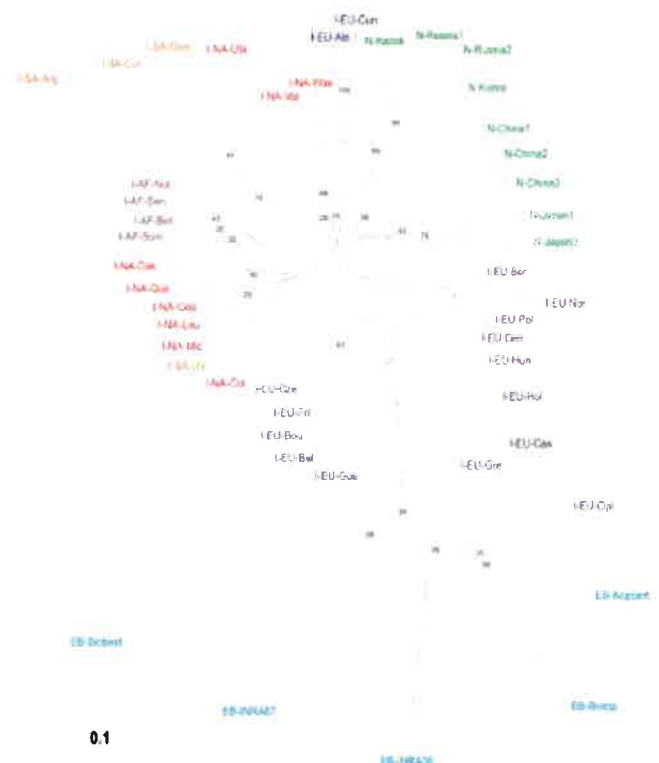
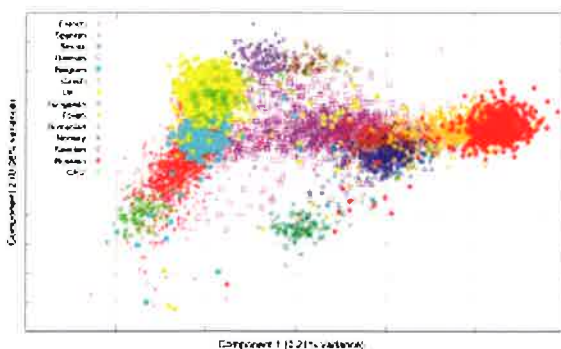
5

Retracer les routes d'invasion

Méthodes « anciennes »:

→ Reconstruction d'arbres

→ Analyses statistiques type ACP



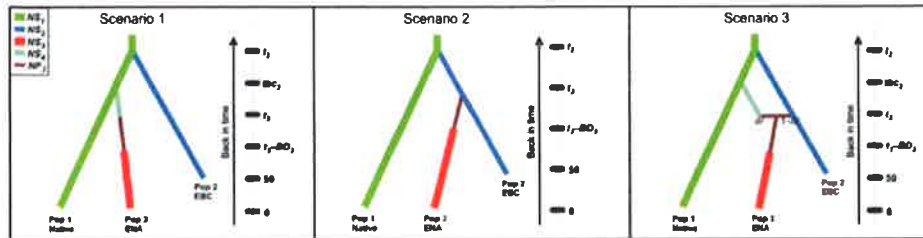
6

Retracer les routes d'invasion

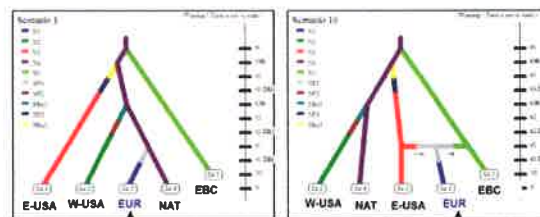
Les méthodes **ABC** (Approximate Bayesian Computation):

- ABC « standard »
- ABC random forest (ABC associé à des algorithmes de « forêts aléatoires »)

→ Permettent de choisir le scénario d'introduction le plus probable parmi un ensemble de scénarios comparés



Discriminate among different (complex) scenarios



Origin: native area

Prob = 0.015

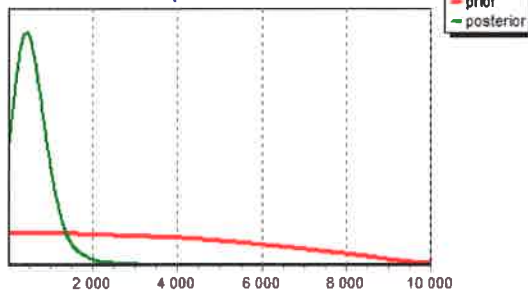
Origin: admixture E-USA + EBC

Prob = 0.985

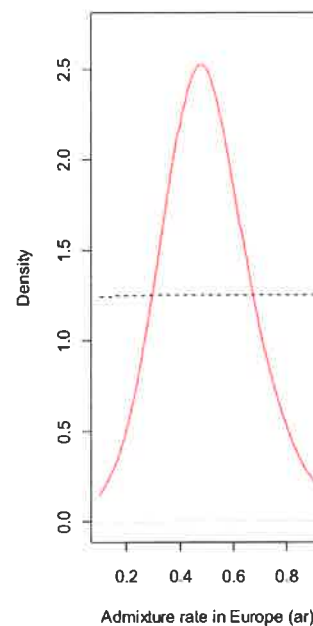
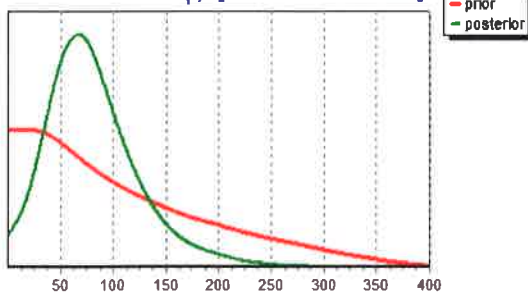
7

...et estimations de paramètres démographiques d'intérêt pour un scénario donné

Parameter : t_p [median=5.51E+002]



Parameter : $4N\mu$ [median=7.47E+001]

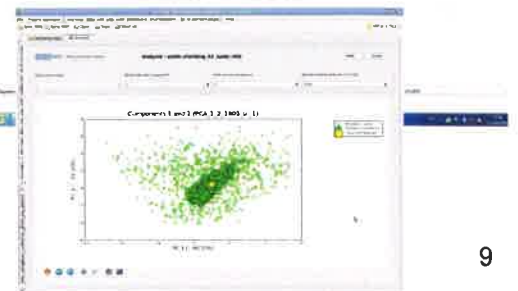
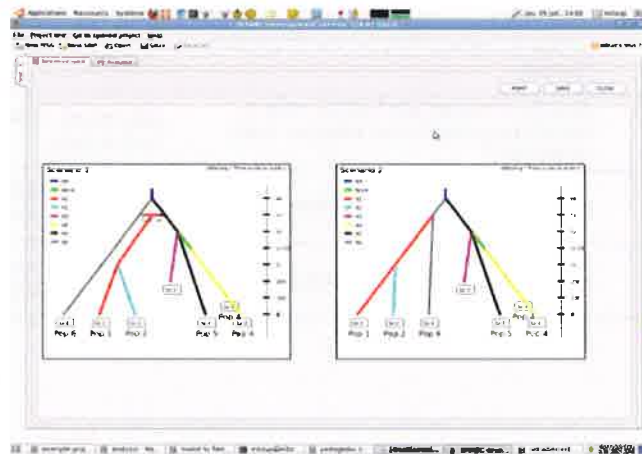


8

Retracer les routes d'invasion

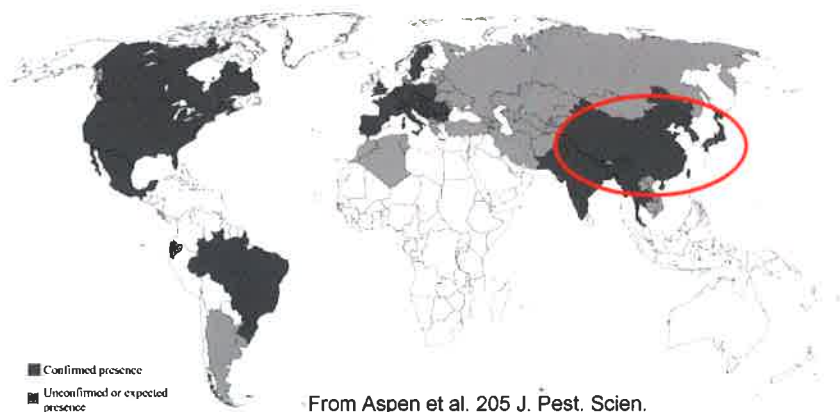
DIYABC: software doté d'une interface conviviale pour faire des inférences statistiques ABC sur l'histoire des populations à partir de données génétiques

- Cornuet J-M, Santos F, Robert PC, Marin J-M, Balding DJ, Guillemaud T, Estoup A (2008) Inferring population history with DIYABC: a user-friendly approach to Approximate Bayesian Computation. *Bioinformatics*, 24, 2713-2719.
- Cornuet JM, Ravigné V, Estoup A (2010) Inference on population history and model checking using DNA sequence and microsatellite data with the software DIYABC (v1.0). *BMC bioinformatics*, 11, 401doi:10.1186/1471-2105-11-401.
- Cornuet J-M, Pudlo P, Veyssier J, Dehne-Garcia A, Gautier M, Leblois R, Marin J-M, Estoup A (2014) DIYABC v2.0: a software to make Approximate Bayesian Computation inferences about population history using Single Nucleotide Polymorphism, DNA sequence and microsatellite data. *Bioinformatics*.
- Software DIYABC (V1. and V2.) : <http://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/diyabc>.



9

Drosophila suzukii: drosophile à ailes tachetées ou moucheron asiatique (cf. spotted-wing drosophila)
→ même groupe d'espèces que *D. melanogaster*



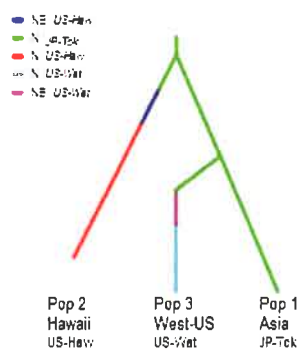
- 23 sites géographiques échantillonnés (aires native et envahie)
- Marqueurs moléculaires = 25 locus microsatellites (30 inds. par échantillon)

10

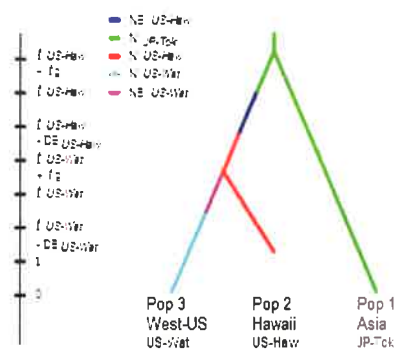
Model choice analysis	Number of compared scenarios	Tackled question	Potential source genetic group
1a 1b 1c	3	What are the origins of West-US populations?	Asia, Hawaii
1d	7	What are the relations among West-US populations and their extra-continental sources?	Asia, Hawaii, US-Wat, US-Sok, US-SD
2a	6	What are the origins of East-US populations?	Asia, Hawaii, West-US
2b	6	What are the origins of European populations?	Asia, Hawaii, West-US
3a	10	Is there asymmetrical gene flow from Europe to East-US ?	Asia, Hawaii, West-US, Europe
3b	10	Is there asymmetrical gene flow from East-US to Europe?	Asia, Hawaii, West-US, East-US
4	2	Does the admixture with East-US genes in North-Europe result from a secondary Asian introduction?	Asia, Hawaii, West-US, East-US South-Europe
5a	21	What are the origins of the Brazilian population?	Asia, Hawaii, West-US, East-US South-Europe, North-Europe
5b	21	What are the origins of La Reunion population?	Asia, Hawaii, West-US, East-US South-Europe, North-Europe

Analyse 1a

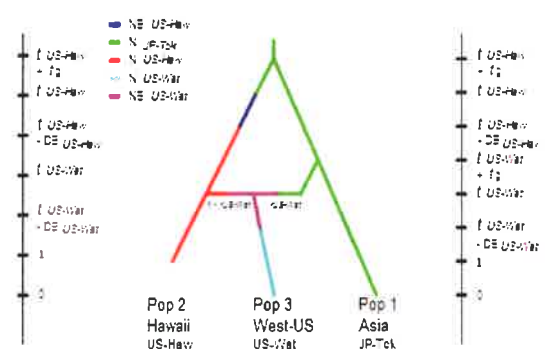
Scenario 1: Asian origin



Scenario 2: Hawaiian origin



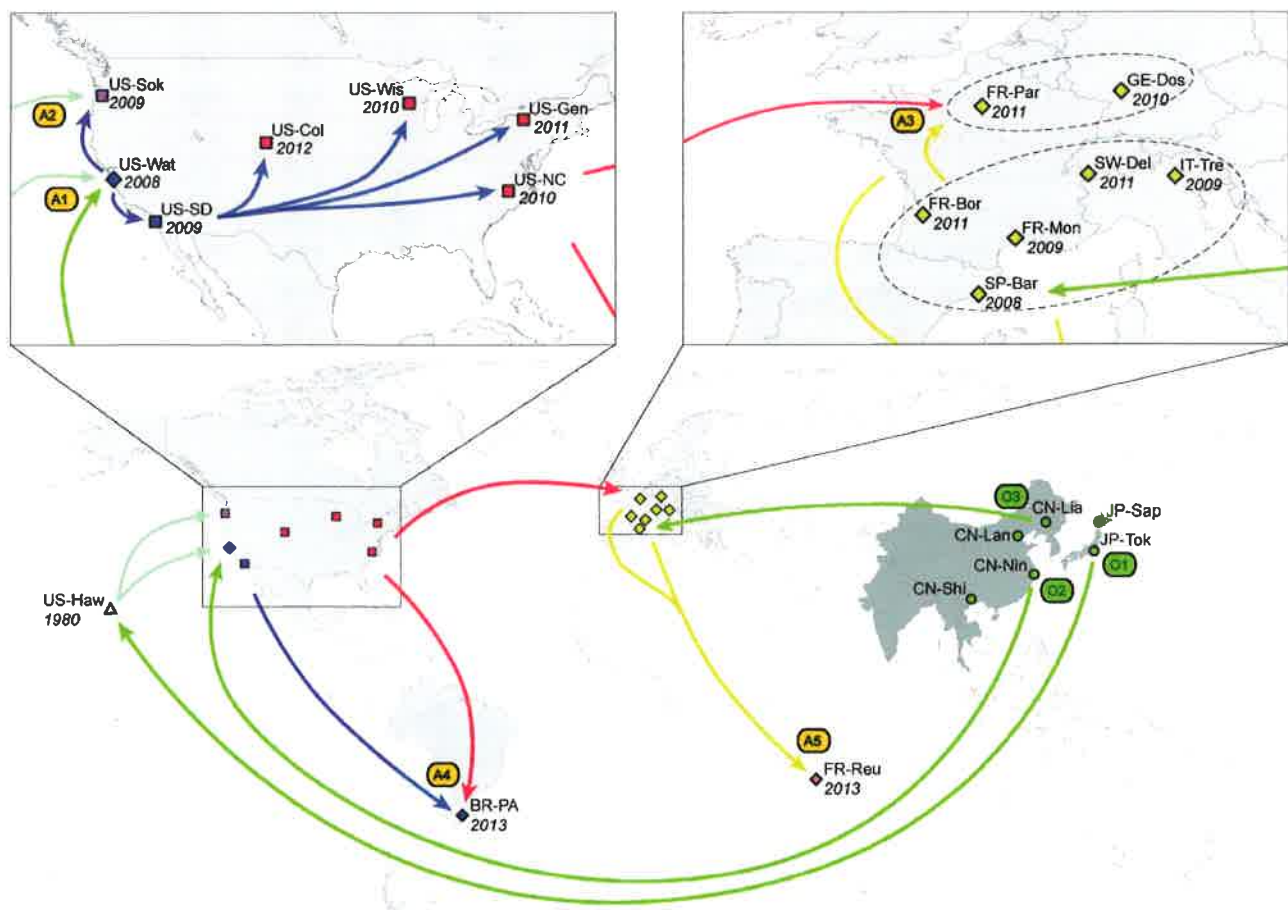
Scenario 3: Admixed origin



Choix de scenarios: résultats pour les 11 analyses successives en ABC random forest

Analysis	Total n° of scenarios	Number of Sum. Stats.	ABC-RF		Origin of the focal population (best model) using ABC-LDA and ABC-RF
			Posterior probability of the best model (s.d.)	Prior error rate (s.d.)	
1a	3	39	1.000 (= 0.001)	0.100 (= 0.002)	Asia - Hawaii
1b			0.989 (= 0.005)	0.094 (= 0.001)	
1c			0.998 (= 0.002)	0.096 (= 0.001)	
1d	7	130	0.690 (= 0.018)	0.327 (= 0.001)	Asia - Hawaii
2a	6	130	0.779 (= 0.019)	0.232 (= 0.001)	West-USA
2b	6	130	0.716 (= 0.013)	0.232 (= 0.001)	Asia
3a	10	204	0.510 (= 0.014)	0.408 (= 0.001)	Asia
3b	10	204	0.744 (= 0.020)	0.328 (= 0.001)	West-USA
4	2	301	1.000 (= 0.009)	0.121 (= 0.001)	South Europe - East-USA
5a	21	424	0.631 (= 0.034)	0.294 (= 0.001)	West-USA - East-USA
5b	21	424	0.500 (= 0.027)	0.298 (= 0.001)	North-Europe - South-Europe

13

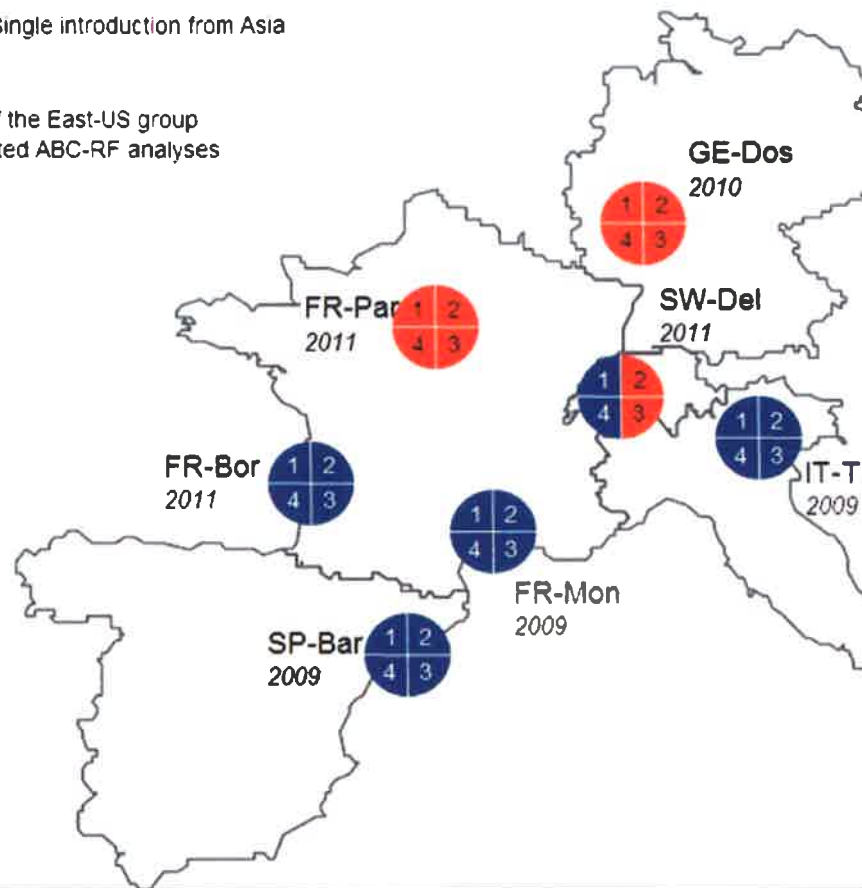


Best model = Admixture between Asia and East-US

Best model = Single introduction from Asia

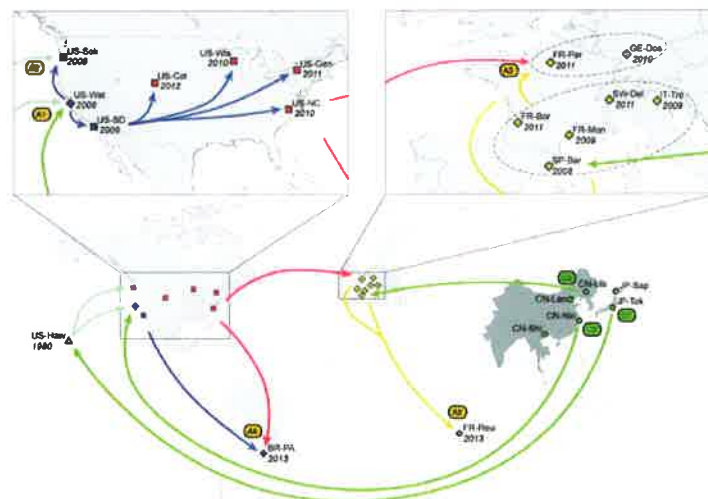
Source sample site of the East-US group used for each replicated ABC-RF analyses

- 1 US-NC
- 2 US-Wis
- 3 US-Gen
- 4 US-Col



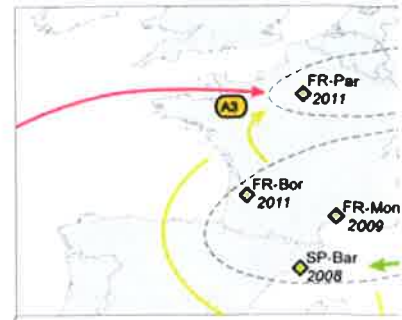
15

	Admixture event	Admixture rate (gene fraction from pop x)	mean	median	mode	q5%	q95%
Prior 1	A1 (US-Wat = US-Haw + CN-Nin)	r_{US-Wat} (China – CN-Nin)	0.759	0.761	0.774	0.659	0.854
	A2 (US-Sok = US-Haw + US-Wat)	r_{US-Sok} (USA – US-Wat)	0.237	0.230	0.227	0.092	0.400
	A3 (DE-Dos = IT-Tre + US-NC)	r_{DE-Dos} (USA – US-NC)	0.286	0.278	0.266	0.112	0.481
	A4 (BR-PA = US-NC + US-SD)	r_{BR-PA} (USA – US-SD)	0.467	0.461	0.442	0.187	0.754
	A5 (FR-Reu = IT-Tre + GE-Dos)	r_{FR-Reu} (Europe – GE-Dos)	0.388	0.380	0.426	0.132	0.670
Prior 2	A1 (US-Wat = US-Haw + CN-Nin)	r_{US-Wat} (China – CN-Nin)	0.761	0.762	0.766	0.684	0.833
	A2 (US-Sok = US-Haw + US-Wat)	r_{US-Sok} (USA – US-Wat)	0.224	0.219	0.199	0.114	0.350
	A3 (DE-Dos = IT-Tre + US-NC)	r_{DE-Dos} (USA – US-NC)	0.312	0.306	0.284	0.152	0.487
	A4 (BR-PA = US-NC + US-SD)	r_{BR-PA} (USA – US-SD)	0.422	0.418	0.429	0.247	0.613
	A5 (FR-Reu = IT-Tre + GE-Dos)	r_{FR-Reu} (Europe – GE-Dos)	0.370	0.368	0.356	0.178	0.569



16

- Flux de gènes entre populations via dispersion continue ou admixture(s) ponctuelle(s) → disseminations de variants alléliques et de nouvelles mutations → conséquences fortes sur les trajectoires évolutives des populations.
- **Admixture asymétrique**: USA → Europe (pops nord-est) → **variants émergent aux USA diffuseront probablement en Europe (et pas l'inverse)**
- **Csq générale**: d'un point de vue évolutif les pops Europe "suivront" les pops USA
- **Csq appliquées**: si apparition de résistance aux pratiques de contrôle émergent aux USA → effort spécial pour éviter importation de *D. suzukii* de USA en Europe cf. minimiser l'évolution de résistances en Europe et donc dégâts sur cultures

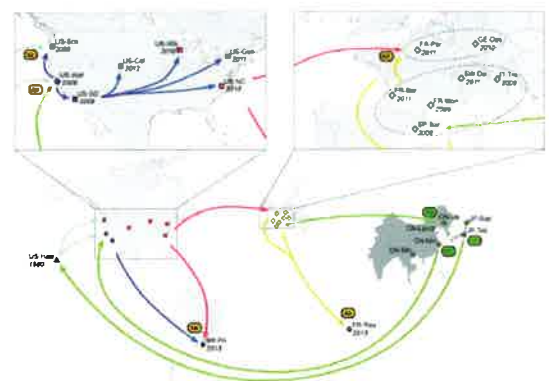


17

Introduction type	Sample site	Prior 1					Prior 2				
		mean	median	mode	q5%	q95%	mean	median	mode	q5%	q95%
Extra continental	US-Haw	0.517	0.500	0.495	0.326	0.755	0.490	0.484	0.477	0.382	0.615
	US-Wat	0.181	0.138	0.114	0.041	0.448	0.143	0.127	0.118	0.059	0.275
	IT-Tre	0.268	0.179	0.171	0.059	0.837	0.236	0.189	0.172	0.101	0.553
	BR-PA	0.158	0.126	0.104	0.020	0.407	0.208	0.193	0.172	0.067	0.399
	FR-Reu	0.259	0.215	0.186	0.051	0.626	0.245	0.214	0.190	0.069	0.534
Intra continental	US-SD	0.135	0.117	0.106	0.039	0.283	0.117	0.104	0.091	0.053	0.224
	US-NC	0.089	0.067	0.061	0.015	0.230	0.111	0.098	0.090	0.046	0.218
Extra + intra continental	US-Sok	0.116	0.099	0.088	0.027	0.250	0.119	0.106	0.099	0.052	0.229
	GE-Dos	0.189	0.177	0.155	0.061	0.356	0.205	0.189	0.171	0.088	0.372
Prior values		0.628	0.199	NA	0.021	1.904	0.517	0.500	NA	0.326	0.754

Type d'introduction et sévérité de la réduction de la diversité génétique

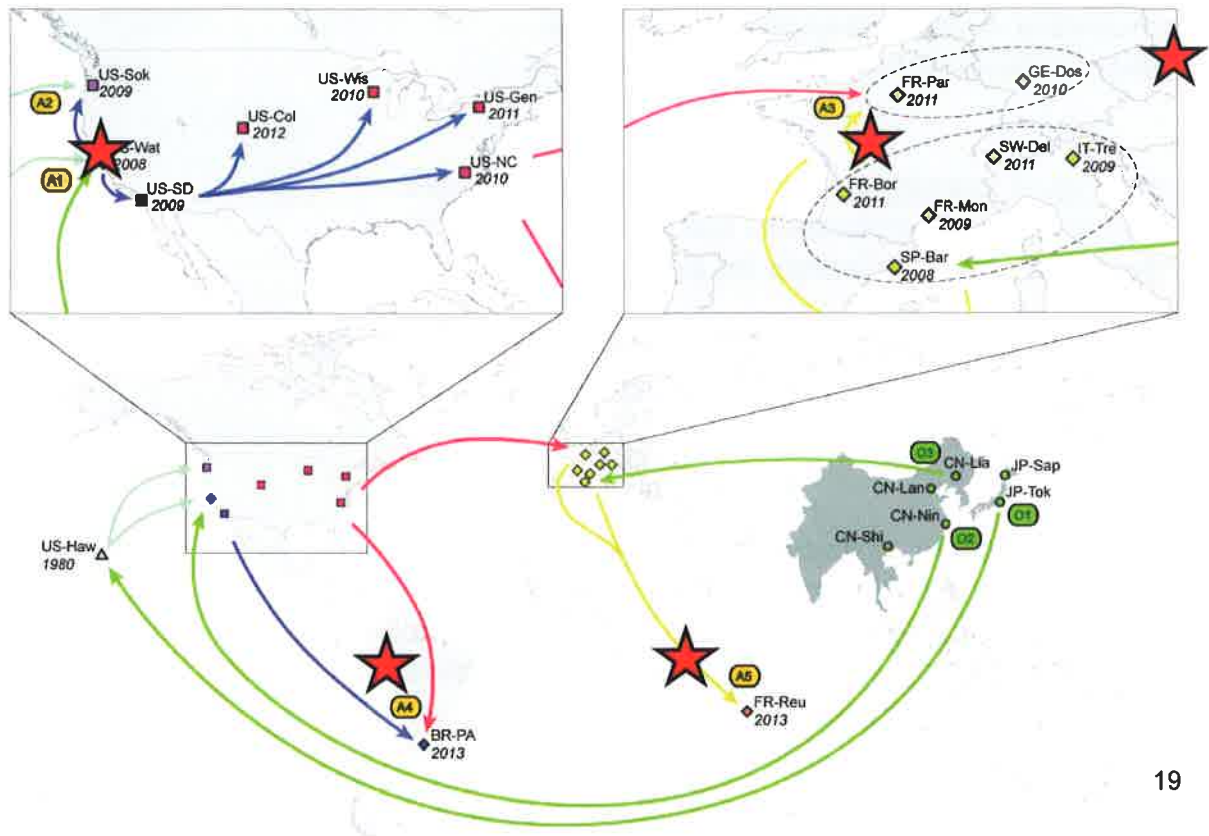
- Pops fondées par ind. du même continent = bottleneck "faible" → nbre élevé de fondateurs + flux de gènes récurrents.
- Pops fondées par ind. d'un autre continent = bottleneck "fort" → nbre faible de fondateurs + pas de flux de gènes récurrents.
- Pops fondées par ind. d'un autre + même continent = bottleneck "faible à modéré" → introductions multiples restaurent la diversité.



18

Puissance de certaines inférences à améliorer

→ Augmenter le nbre de marqueurs génétiques (technologies NGS)
+ autres échantillons



19

– PERSPECTIVES GENERALES –

Routes d'invasion → routes d'adaptation
Lien entre génotype et phénotype

Routes d'invasion = histoires démographiques évolutivement neutres



Routes d'adaptation = bases et architectures génomiques des changements adaptatifs ayant cours pendant une invasion → collaboration with Mathieu Gautier

- Genotypage de l'ensemble du génome → NGS = New Generation Sequencing technologies
- Phenotypage de traits d'histoire de vie (THV) → ceux susceptibles d'évoluer au cours de l'invasion (ex. résistances aux insecticides, spécialisation sur plantes-hotes, capacité d'oviposition (morphologie ovipositeur, choix de substrats), dispersion (morphologie des ailes), capacité immunologiques (mélánisation).
- Variables bioclimatiques → adaptation à des facteurs abiotiques (température, humidité,...).

20



Drosophila suzukii: Bilan du projet CASDAR 2013- 2016

Claire Weydert, Yannick Trottin, Jean-François Mandrin – Ctifl
Avec la contribution de tous les partenaires



MINISTÈRE
DE L'AGRICULTURE
DE L'AGROALIMENTAIRE
ET DE LA FORÊT

avec la contribution financière du
compte d'affectation spéciale
«Développement agricole et rural»



Programme financé par le Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la forêt

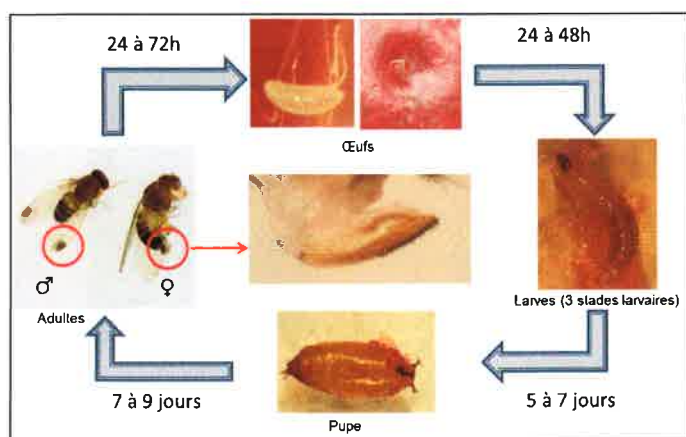
Journées *Drosophila suzukii*

1^{er} et 2 décembre 2016



Contexte

- *Drosophila suzukii*, observée la première fois au Japon en 1916
- Une espèce invasive en expansion
- En France : présente dans toutes les régions, dégâts variables et hétérogènes
Contrairement aux autres espèces de drosophiles, ponte dans des fruits sains



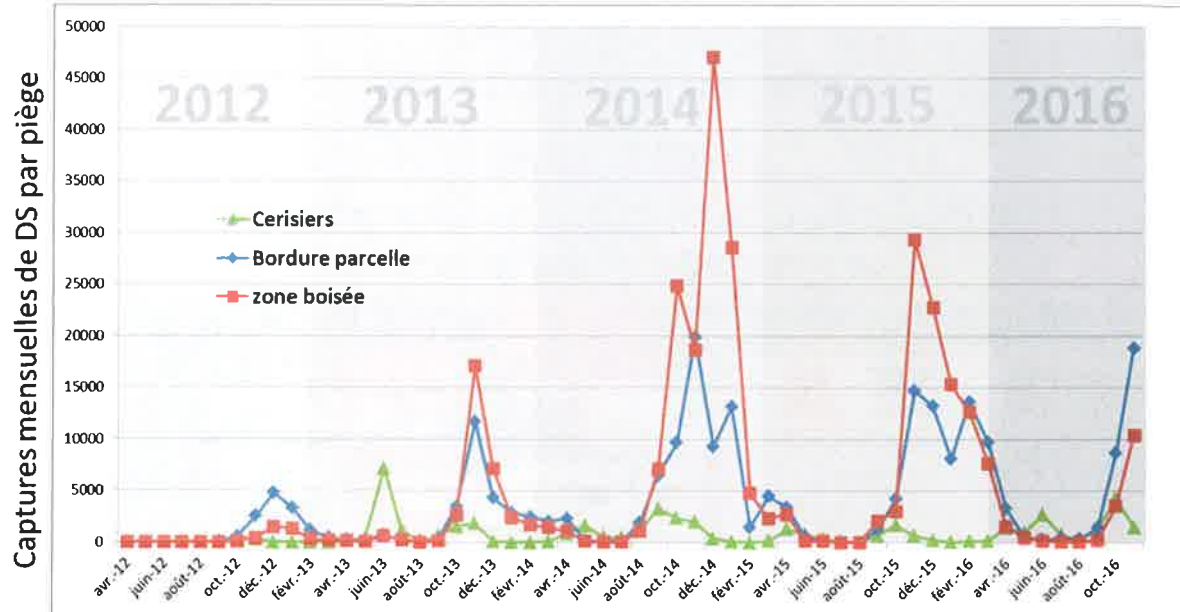
Cycle de *D. suzukii* (étudié sur fraise à 20°C)



Dégâts de *D. suzukii* sur fraise et cerises



Biologie et comportement du ravageur



Suivi des vols de *D. suzukii* de 2012 à 2016 dans des parcelles de cerisier et environnement, dans le sud de la France.



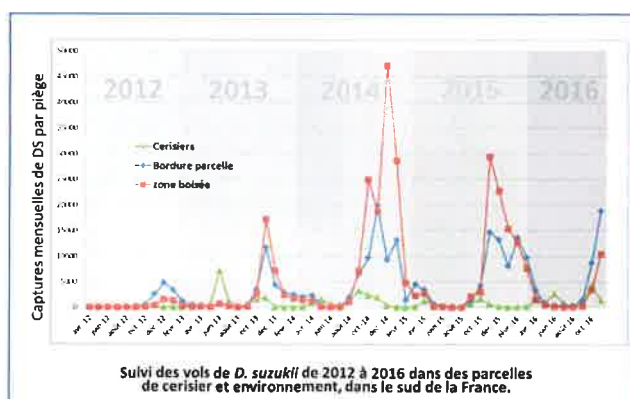
Biologie et comportement du ravageur

Amélioration des connaissances sur l'insecte

- Migrations de l'insecte entre cultures et environnement
- Connaissance des plantes hôtes cultivées et sauvages
- Hivernation au stade adulte dans des zones « refuges »
- Espèce très sensible aux conditions chaudes et sèches
- Captures variables/ tendance à l'augmentation



Arbutus unedo (arbousier) et *Sambucus nigra* (sureau noir) attaqués par *D. suzukii*



Suivi des vols de *D. suzukii* de 2012 à 2016 dans des parcelles de cerisier et environnement, dans le sud de la France.



Piège artisanal utilisé pour le suivi de *D. suzukii*

Des questions subsistent:

- Les captures reflètent-elles la réalité des densités de population de *D. suzukii*?
- Correlation entre captures et dégâts?



Prophylaxie

- Pas de mise en évidence d'une sensibilité variétale (en conditions contrôlées sur cerise et fraise)
- Fermentation anaérobie/ solarisation = meilleure méthode de destruction des déchets de récolte.
- Efficacité d'une montée en température en fin de culture sous abris en conditions expérimentales.
- Passage au froid post récolte = partiellement efficace sur cerise pour ralentir le développement des larves et l'évolution des dégâts.



Evaluation de la sensibilité variétale sur fraise



Favorable
à *D. suzukii*



Défavorable
à *D. suzukii*

Prophylaxie = Essentielle!

- Aération des cultures: arbres et plants
- Contrôle de l'enherbement
- Pas de fruits en sur-maturité
- Récoltes fréquentes
- Gestion des déchets

Des questions subsistent:

- Incidence de l'environnement ?
- Prophylaxie en fin de culture: méthodes à préciser/ toutes cultures



Application de produits

- Evaluation de produits seuls ou en combinaison dans des stratégies sur cerise, fraise, framboise
- Pas de produits présentant 100% d'efficacité
- Stratégies efficaces en pression ravageur faible à moyenne
- Très peu de possibilités en AB (argiles, spinosad)
- Des effets sur les cortèges d'auxiliaires/ ré-émergence de certains ravageurs



Des questions subsistent:

- Durabilité des stratégies chimiques - Risques de résistance?
- Disponibilité à l'avenir en produits de biocontrôle?
- Solutions innovantes: attractifs, répulsifs, nouveaux modes d'application...



Filets insect-proof

- Taille des mailles: moins de 1mm² (pour éviter tout passage : 10x8 = 710x 960µm)
- Quelle que soit la culture: réduction des populations et dégâts

Cerisier:

Protection très coûteuse

Protection rang par rang (maille 6x8): 100% d'efficacité contre *D. suzukii* et *R. cerasi*. Peu d'effets secondaires/ climat, auxiliaires...



Protection mono-rang avec filets et bâches anti-pluie

Fraisier:

Intérêt de la protection en zones à risque – pression *D. suzukii* forte

Efficacité partielle (entrées possibles)

Effets observés sur le climat, l'entrée des auxiliaires et des pollinisateurs, le rendement



Filet sur un tunnel
Photo A. Ginez (Aprel)

Des questions subsistent:

Evaluation technico-économique à approfondir

Efficacité sur l'éclatement, sur le monilia..?

Efficacité en cas de généralisation

Vergers entièrement protégés: étude en cours.

Evaluation du risque?

Mise en place temporaire selon le risque?

Risque de maintien d'autres ravageurs?



Piégeage massif

- Evaluation de dizaines de pièges et attractifs au laboratoire et dans les cultures.
- Pas de solution (artisanale ou industrielle) révolutionnaire!
- En vergers de cerisiers, trois type de dispositifs testés: pas d'efficacité démontrée dans les conditions optimales d'utilisation.
- Sur petits fruits sous abris : les résultats ne permettent pas de conclure.



+



Essais de piégeage massif en verger de cerisiers et autour d'un tunnel de fraise

• Des questions subsistent:

Attractivité des fruits à maturité >> attractivité des pièges?

Des progrès importants à faire sur l'attractivité des pièges et attractifs.

Recherche de stratégie push-pull?



Lutte biologique

Introduction de parasitoïdes indigènes

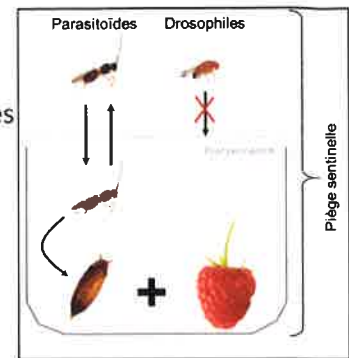
Essais préliminaires au laboratoire (CNRS) sur 7 candidats

Trichopria drosophilae (parasitoïde de pupes) testé en cultures de fraises

Recherche de parasitoïdes exotiques:

Prospection en Asie (projet DROPSA)

Etude au laboratoire d'un premier candidat (*Asobara japonica*)



Principe du piège sentinelle

Lutte biologique par conservation: étude du parasitisme indigène

Prospection avec des « pièges sentinelles »

2 parasitoïdes identifiés: *Trichopria drosophilae*, *Pachycrepoideus vindemmiae*.

Parasitisme très variable : 23% de pupes parasitées en moyenne.

Des questions subsistent:

- Impact du parasitisme indigène/ capacité d'adaptation?
- Perspectives de stratégies avec des parasitoïdes exotiques?
- Régulation par d'autres auxiliaires?



Pachycrepoideus vindemmiae



Trichopria drosophilae



Perspectives

- De nombreux acquis dans le cadre du projet mais les travaux sont à poursuivre
- *D. suzukii*: un ravageur encore mal maîtrisé
- Nécessité de poursuivre un travail collaboratif coordonné de tous les acteurs pour apporter des solutions concrètes aux filières.
- Besoin de moyens pour la recherche, l'expérimentation, le développement...



Autres méthodes de protection à approfondir

- Outils d'aide à la décision: modélisation et évaluation du risque
- Lutte autocide – SIT
- Plantes pièges - stratégies push-pull – phéromones...



Documents
en ligne sur <http://www.ctifi.fr>
→ Espace professionnels
→ Protection des plantes



*Merci à tous les partenaires du projet,
aux collègues et stagiaires impliqués.
Merci de votre attention !*



MINISTÈRE
DE L'AGRICULTURE
DE L'AGROALIMENTAIRE
ET DE LA FORÊT

avec la contribution financière du
compte d'affectation spéciale
«Développement agricole et rural»



Programme financé par le Ministère de
l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la forêt



DROPSA implique 26 partenaires en Europe, Asie, Nouvelles Zélande et Amérique du Nord.

Il se concentre sur les menaces nouvelles et émergentes dues à *Drosophila suzukii*, et les agents pathogènes bactériens *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae*, *Xanthomonas fragariae* et *X. arboricola* pv. *Pruni*.

Ces agents pathogènes et *Drosophila suzukii* sont une préoccupation et un défi majeurs pour l'industrie des fruits car leur éradication ou leur confinement n'est plus possible. Par conséquent, le développement d'une gestion intégrée ciblée de ces ravageurs est essentiel pour minimiser l'impact économique sur la production de fruits dans la région de l'UE.

EU subvention 6 M€



THEME [KBBE.2013.1.2-04]
[Control of pests and pathogens affecting fruit crops]



Partenaires

- 1 THE SECRETARY OF STATE FOR ENVIRONMENT, FOOD AND RURAL AFFAIRS Fera United Kingdom
- 2 STICHTING DIENST LANDBOUWKUNDIG ONDERZOEK DLO Netherlands
- 3 CAB INTERNATIONAL CABI United Kingdom
- 4 UNIVERSITAT DE GIRONA UdG Spain
- 5 ALMA MATER STUDIORUM-UNIVERSITA DI BOLOGNA UNIBO Italy
- 6 UNIVERSITY OF LEEDS UoL United Kingdom
- 7 UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALENCIA UPV Spain
- 8 IMPERIAL COLLEGE OF SCIENCE, TECHNOLOGY AND MEDICINE Imperial United Kingdom
- 9 CONSIGLIO PER LA RICERCA E LA SPERIMENTAZIONE IN AGRICOLTURA CRA Italy
- 10 EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANISATION EUROPEAN AND MEDITER. France
- 11 INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE INRA France
- 12 ENDOTERAPIA VEGETAL SL ENDOTERAPIA VEGETAL Spain
- 13 Oxitec Limited Oxitec Limited United Kingdom
- 14 JULIUS KUHN-INSTITUT BUNDESFORSCHUNGSINSTITUT FÜR KULTURPFLANZEN JKI Germany
- 15 Eidgenössisches Departement für Wirtschaft, Bildung und Forschung EAER Switzerland
- 16 UNIVERSITA DEGLI STUDI DI PADOVA UNIPD Italy
- 17 Agriculture and Agri-Food Canada AAFC Canada
- 18 The New Zealand Institute for Plant and Food Research Limited PFR New Zealand
- 19 Agricultural Research Service - United States Department of Agriculture ARS-USDA United States
- 20 YUNNAN AGRICULTURAL UNIVERSITY YAU China (People's Republic of)
- 21 PHEROBANK BV Pherobank Netherlands
- 22 AGRIFUTUR SRL AGF Italy
- 23 NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY Hokkaido University Japan
- 24 ECOLOGIA Y PROTECCIÓN AGRÍCOLA SL EPA Spain
- 25 Handelsonderneming Vlamings B.V. VLAM Netherlands
- 26 INSTYTUT OGRODNICTWA Inhort Poland

Sans financement

Objectifs

- Déterminer les voies d'introduction et de dissémination de *Drosophila suzukii* et des pathogènes
- Élaborer des stratégies et des recommandations préventives contre l'introduction de parasites et de maladies des fruits.
- Etudier la biologie et l'écologie de *D. suzukii* et l'épidémiologie de *Pseudomonas syringae* pv *actinidiae*, *Xanthomonas fragariae* et *Xanthomonas arboricola* pv *pruni*, et développer des méthodes de prévention et de contrôle durables.
- Développer des solutions pratiques, efficaces et novatrices pour contrôler *D. suzukii* et les agents pathogènes, et transférer les meilleures pratiques pour les stratégies de lutte intégrée.
- Développer des systèmes de prévision et d'aide à la décision ainsi que pour la gestion des risques.
- Fournir des analyses économiques pour la prise de décision dans la mise en œuvre de solutions pratiques pour protéger le secteur des fruits de l'UE.



Work packages

WP 1 Pathways of introduction of fruit pests and Pathogens

WP 2 Biology and Ecology of *Drosophila suzukii*

WP 3 Biology and epidemiology of quarantine fruit crop diseases

WP 4 Effective and innovative solutions to control *Drosophila suzukii*

WP 5 Effective and innovative solutions for quarantine fruit crop disease control

WP 6 Practical solutions for control

WP 7 Economic analysis

WP 8 Dissemination

WP 9 Management and coordination

Work package 2: Biology and Ecology of *Drosophila suzukii*

• Task 2.1. Life cycle and environmental requirements

- Life cycle and environmental requirements (temperature, humidity, etc.) of *D. suzukii* under various climatic conditions, both in the field and in the laboratory. Characteristics such as overwintering physiology and survival, generation times, lower and upper temperature thresholds, cold and heat tolerance will be gathered for all developmental stages and a day-degree model developed.
- In the field, studies will be made along elevation gradients in the Alps. The circadian cycle, using simulated environmental conditions and field observations, will also be studied since various characteristics related to the efficacy of control methods vary during the day (e.g. adult migration, insecticide resistance, metabolism, oviposition, mating). These data will be essential to the development of integrated control strategies. Climatic requirements will also be used for climate mapping.

• Task 2.2. Host range and spatial ecology

- Host range will be compared in the field and in the laboratory. Field collections of potential host fruits (cultivated, wild and ornamentals) will be carried out in various regions where the fly already occurs and relative levels of attack will be calculated. In the laboratory, no-choice and choice oviposition and development tests will be carried out with cultivated and wild fruits and compared to field observations (DLO). The level of damage to cultivated and wild fruits will be related to fly density, host-related fecundity and host fruit availability. The susceptibility and damage levels on various fruit varieties (e.g. strawberry, peach/nectarine, grape) will be investigated since there is evidence of a variation in susceptibility according to the nature of the cluster and skin toughness (DLO, UNIPD, CABI).
- Spatial ecology of *D. suzukii* will be studied with a large scale landscape approach to gather information on its distribution and the role played by the composition of the farmscape on its abundance. Habitat preference will be investigated through surveys (based on trapping and fruit collection), from farmscape dominated by monoculture to mosaics of fruit orchards and uncultivated area as well as urban areas. Spatio-temporal patterns will be investigated also at the interface among different fruit orchards or between cultivated and uncultivated areas to characterize the specific role of these environments on *D. suzukii* spread

Work package 2: Biology and Ecology of *Drosophila suzukii*

• Task 2.3. Natural enemies and other mortality factors

- Information required to develop biological control strategies against *D. suzukii* will be collected and collated (T4.2). Partial life tables for *D. suzukii* will be carried out in Switzerland, France and SW China to investigate the relative importance of natural mortality factors throughout the life cycle of the fly. Both a cultivated and a wild habitat will be chosen in each country. Emphasis will be placed on the qualitative and quantitative assessment of natural enemies (parasitoids, predators and pathogens) that can be used as biological control agents, and in their impact on *D. suzukii* populations. Natural enemies will also be sampled in various regions of occurrence in Europe, North America and East Asia (in the region of origin of *D. suzukii*), using standard methods on cultivated and wild host plants. Since puparia are difficult to find in the field, puparia from laboratory rearing will be exposed to monitor for and identify pupal parasitoids.

• Task 2.4. Semiochemicals of *D. suzukii*

- This task will focus on identification of attractive compounds for *D. suzukii*: Identification of compounds involved in the attraction of *D. suzukii* to infested and non-infested fruits of different species and fruit developmental stages. Identified compounds from fruits will be compared with those already identified as attractants in wine and vinegar and reported in the literature. Comparisons will also include fruits infested with different yeast types that are specifically associated with *D. suzukii* (YAU, Pherobank, CABI, USDA, PFR). Identification and testing of attractiveness of compounds emitted by *D. suzukii*, such as those involved in courtship and mating behaviour. Information will be used to develop trapping methods in task T4.1. (UPV, Pherobank, YAU) In lab and field tests, identified and selected, (blends of) compounds will be tested on attractiveness for *D. suzukii* and compared with the best attractants currently available and used in practice (YXAU, UPV, Pherobank).

• Task 2.5. Natural dispersal capacities

- Dispersal studies will be carried out with the mark-recapture technique. For this purpose γ -irradiated sterilized flies will be released in a central point and recaptured in trap grid. This trial will be repeated in cold and warm seasons to study the influence of weather conditions in fly dispersal ability (UPV).

Work package 4: Effective and innovative solutions to control *Drosophila suzukii*

Task 4.1. Semiochemical-based technologies: monitoring, mass-trapping, lure & infect (Task leader UPV)

- a. Physical design of traps (e.g. shape, colour, entry points)
- b. Blending and optimal release rate of attractants.
- c. Efficacy of the trapping.
- d. Lure & infect strategies entomopathogenic fungi identified.
- e. Protocols based on molecular markers (qPCR) for entomopathogenic fungi.

Task 4.2. Biological control (task leader INRA)

a. **Classical biological control** by introduction: biology/ecology of parasitoids in China and Japan, their specificity for *D. suzukii*. A report assessing the risks and benefits of introductions no release of exotic parasitoids.

b. **Augmentative biological control:**

- Commercially available biological control agents will be tested on *D. suzukii* in laboratory and field conditions.
- The best entomopathogenic fungi will be used in lure & infect strategies and in combination with synergising factors.
- Natural enemies identified in T.2.3 will be tested in the laboratory and in the field in their respective areas as appropriate.
- Venom virulence factors (mainly proteins) necessary for exotic parasitoids success on *D. suzukii* will be determined using transcriptomics and proteomics and used as marker for the selection of local parasitoids of *Drosophila* spp. The success of the selected versus exotic parasitoids will be compared under quarantine and conditions and in experimental greenhouses for non-exotic parasitoids.
- Insecticides (T4.3) and biological control-based strategies will be evaluated to deliver integrated approaches to be included in the IPM strategies (WP6). (CABI, EV, FERA, INRA).

c. **Conservation biological control:** adaptation of European parasitoids of *Drosophila* spp. to *D. suzukii* will be evaluated through laboratory selection rearing. The attraction of natural enemies to semiochemicals will also be assessed.

Work package 4: Effective and innovative solutions to control *Drosophila suzukii*

Task 4.3. Chemical control (Task leader UNIPD)

- a. Novel as well as already-commercialised insecticides/compounds will be assessed for efficacy against adults and larvae.
- b. Products with the best performances will be tested in experimental fields, and application methods evaluated. Standard laboratory test procedures will be used, including a precision spray apparatus to evaluate a large group of products.
- c. Side-effects on BCAs (T4.2) will be tested.

Task 4.4. Sterile insect techniques (SIT) (Task leader Oxitec)

- a. Insects carrying a Dominant Lethal (RIDL) strains for *D. suzukii*
- b. Chemosterilising agents (UPV, EPA).

Task 4.5. New mode of action compounds (Task leader FERA)

- a. RNA interference (RNAi) using double stranded RNA (dsRNA)
- b. Small agonists/antagonists chemical acting on protein G will be tested.
- c. New microencapsulation methods for stabilising and delivering dsRNA and receptor agonists/antagonists will be developed.

D. suzukii en Suisse

situation 2016

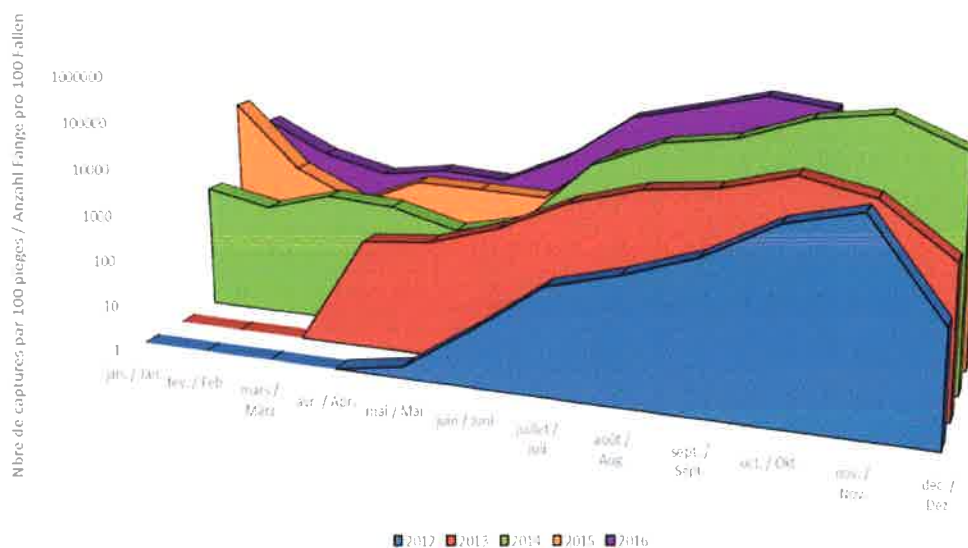
C.A. Baroffio, Serge Fischer

Journées *Drosophila suzukii*, CTIFL Balandran, 1 et 2 décembre 2016

www.agroscope.ch | good food, healthy environment

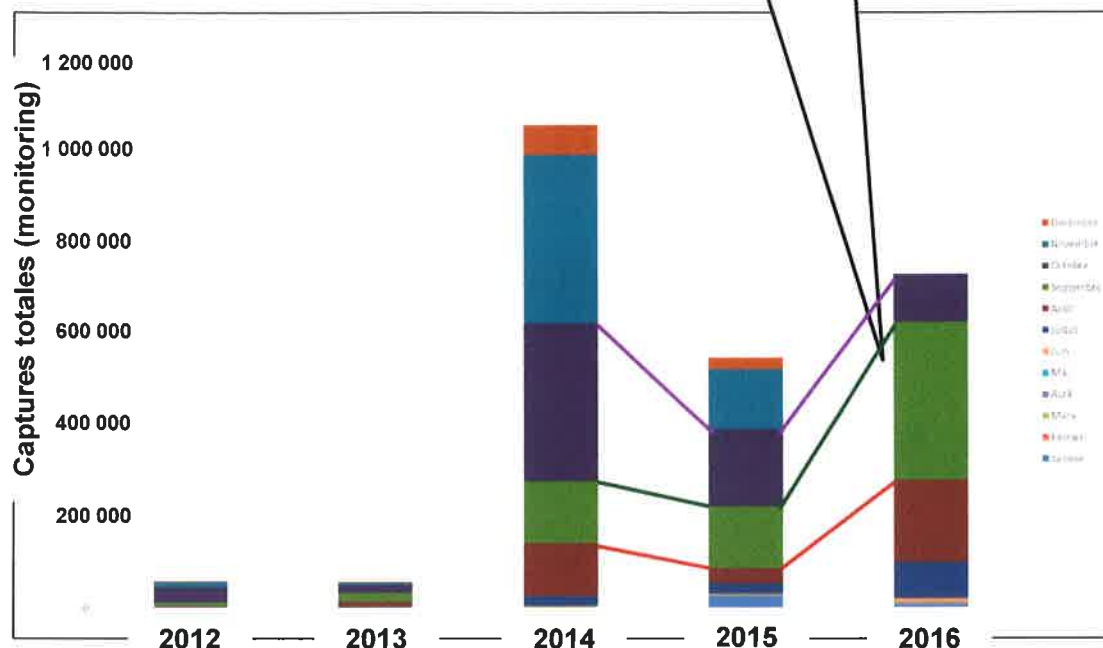
Captures mensuelles 2012-2016

Captures mensuelles / Monatliche Fänge 2012-2016





Captures annuelles 2012-2016



Journées *Drosophila suzukii* CTIFL Balandran 1er et 2 décembre 2016
C.A. Baroffio, S. Fischer: situation 2016 en Suisse

3



Essais 2016 planifiés

La plupart des données sont en cours d'analyse

Cultures	No / Nr	Nom d'essai / Versuchsname	Canton / Kanton	Lieu / Standort	Culture / Kultur	But / Ziel
BAIES	16_B_01	Monitoring	Tous	-	habitats cultivés et sauvages	Surveillance et aide à la décision
	16_B_02_A	Chaux	Valais	Chamoson	framboises Benno	Déterminer l'efficacité des différentes méthodes de lutte (chaux et/ou piégeage) appliquées seules ou ensemble contre <i>D. suzukii</i>
	16_B_02_B	Chaux formulations	Valais	Ardon	cerises Benno	Déterminer l'efficacité des différentes formulations de chaux (solution, poudre, avec/sans adjuvants)
	16_B_03	Liquides	Valais	Vétroz	cerises Benno, haie fougère	Déterminer l'attractivité des différents liquides (liquides mis en pièges Profatec)
	16_B_04	Piégeage hivernal	Valais	Vétroz	cerises Benno, haie fougère	Déterminer l'efficacité de différents pièges en tant que pièges hivernaux
	16_B_05_A	Orifices piège Riga au labo (Serge F.)	Vaud	Changins	laboratoire	Connaitre l'influence de la position des trous sur les captures de D.s. sous conditions constantes
	16_B_05_B	Orifices piège Riga au champs (Répét. essai Serge)	Valais	Vétroz	cerises Benno, haie fougère	Connaitre l'influence de la position des trous sur les captures de D.s. au champs
	16_B_06	Couvercle piège Profatec	Valais	Vétroz	cerises Benno, haie fougère	Connaitre l'influence de la couleur du couvercle Profatec sur les captures de D.s.
	16_B_07_A	Pherocon VS	Valais	Vétroz	cerises Benno, haie fougère	Connaitre l'efficacité du mélange multi lures de Dong Cha contre D.s.
	16_B_07_B	Pherocon TI	Tessin			Connaitre l'efficacité du mélange multi lures de Dong Cha contre D.s.
	16_B_07_C à confirmer	Pherocon BL	Basel	Föllinsdorf	cerises	Connaitre l'efficacité du mélange multi lures de Dong Cha contre D.s.
	16_B_08	trap comparison	Valais	Vétroz	cerises Benno, haie fougère	Connaitre l'influence de la couleur / forme du couvercle sur les captures de D.s.
	16_B_09	Daycycle	Valais	Conthey	cerises Benno, haie fougère	Connaitre l'influence de la couleur du couvercle (rouge / lumineux) et de la période de la journée / saison sur les captures de D.s.
	16_B_10	durée du piégeage	Valais	Conthey	haie fougère	Connaitre l'influence de la durée de piégeage sans vider les pièges / renouveler le liquide sur les captures de D.s.
	16_B_11					
	16_B_12					
	16_B_13	Dissection	Valais	Labo (Conthey)		Evaluer la pertinence de la mise en place d'un système de piégeage hivernal
	16_B_14	Marquage ELISA	Valais			comprendre les déplacements
	16_B_15	Communication				

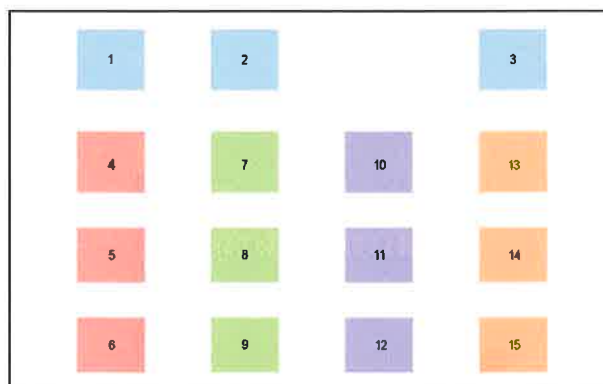
Journées *Drosophila suzukii* CTIFL Balandran 1er et 2 décembre 2016
C.A. Baroffio, S. Fischer: situation 2016 en Suisse

4

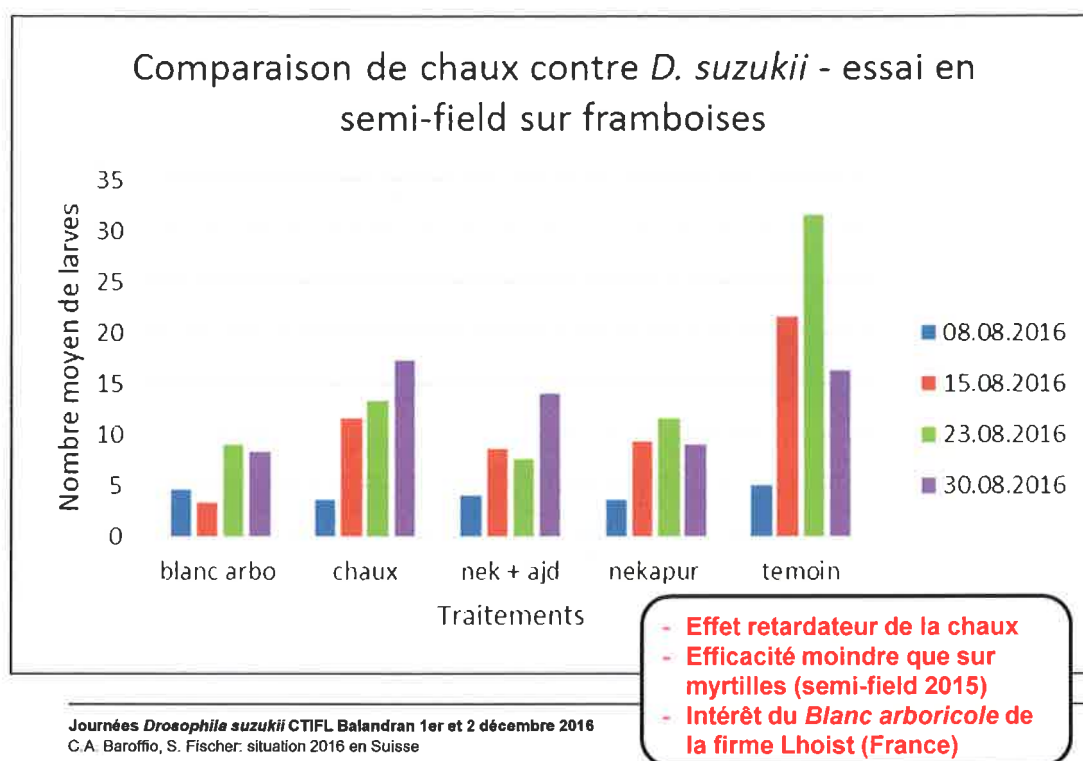
Cultures	Nom d'essai / Versuchsname	Canton / Kanton	Culture / Kultur	But / Ziel	Période / Dauer
BAIES	Monitoring	Tous	habitats cultivés et sauvages	Surveillance et aide à la décision - utilité d'un piégeage hivernal	2012-2016
	Stratégies de lutttes	VS, TI, VD, BL		Efficacité de la chaux - comparaison d'attractifs - Optimisation des pièges (position des trous / couleur)	
	Ecologie	Valais	cerise - haie	activité et comportement sur 24 heures - déplacements	2015-2016
Steinobst	Köderverfahren	AG-BL-SG	Kirschen, Zwetschgen	Prüfung Wirksamkeit der Frasswirkung	Jun 2016
	Netz	AG-BL-SG-BE	Kirschen	Prüfung Ausschlusswirkung Netz, reduzierter PSM-Einsatz	Jun 2016
	Gesteinsmehl	AG-BL-SZ-LU- ZG	Industriekirschen (Dollenseppeler)	Prüfung Wirksamkeit physikalischer Barriere	Jun- Jul 2016
	Insektizid	BE	Zwetschgen (div. Sorten)	Wirkung chem. PSM	Aug-Sep 2016
	Gesteinsmehl, Netz	BL	Kirschen	Prüfung Ausschlusswirkung Netz; Prüfung Unterdrückung der Lockwirkung von Hefen und Mikroorganismen; Prüfung Wirksamkeit physikalischer Barriere	Jun- Juli 2016
	Lokalmonitoring Wädenswil	ZH	Kulturen und Wildhabitate	Überwachung	2016
	Windkanal	ZH		Prüfung der Wirksamkeit von alternativen Wirkstoffen	Mrz- Sept. 2016
	Div. Versuche im Labor, Feld oder Lagerhalle je nach Bedarf	ZH	Kirschen, Zwetschgen		Mrz- Sept. 2016
FIBL	Monitoring	AG, BL, SO	Diverse, auch Wildpflanzen	Monitoring	Apr 2016 - Dez 2016
	Mittelprüfung	AG, BL, SO	Labor & Diverse Kulturen	Labor: Prüfung von 28 verschiedenen Bio-Insektiziden; Freiland: Prüfung von 5 verschiedenen Bio-Insektiziden	Jan 2016 - Nov 2016
	Fallen	AG	Labor & Diverse Kulturen	Labor: Prüfung verschiedener Fallenfarben und Muster; Labor: Prüfung verschiedener Lockstoffe; Freiland: Prüfung verschiedener Falle-Köder- Kombinationen	Nov 2015 - Dez 2016
	Repellenz	AG	Labor & Diverse Kulturen	Untersuchung der Repellenz von ätherischen Ölen	Nov 2015 - Dez 2016
	Grundlagen	AG	Labor	Entwicklung einer Markierungsmethode für das Landschaftsmonitoring	2016/2017
	Prognose	AG	Labor	Datenerhebung und Modellierung	2016-2018
FIBL Reben Agroscope	Sortenanfälligkeit	AG	Labor/Reben	Sortenanfälligkeit interspezifischer Rebsorten	2016
	Monitoring				
	Kalk	GR-LU	versch. Rebsorte	Wirkung und Dosierung	2016
	Netz	GR-TG	versch. Rebsorte	Wirkung	2016
	Insektizide - Combi Protect	TG-TI-BL		Wirkung	2016
	Effeillage	Ticino	Merlot	Efficacité	2016
	Dégustation	Vaud	Mara	Perception du Kaolin et de la Chaux	2016

Essais chaux sur framboises (semi-field) : comparaison de diverses préparations

FRAMBOISIERS	TRAITEMENT
1-3	témoin non traité
4-6	Nekapur 2
7-9	Nekapur 2 + colloïdaux
10-12	chaux
13-15	Blanc arboricole

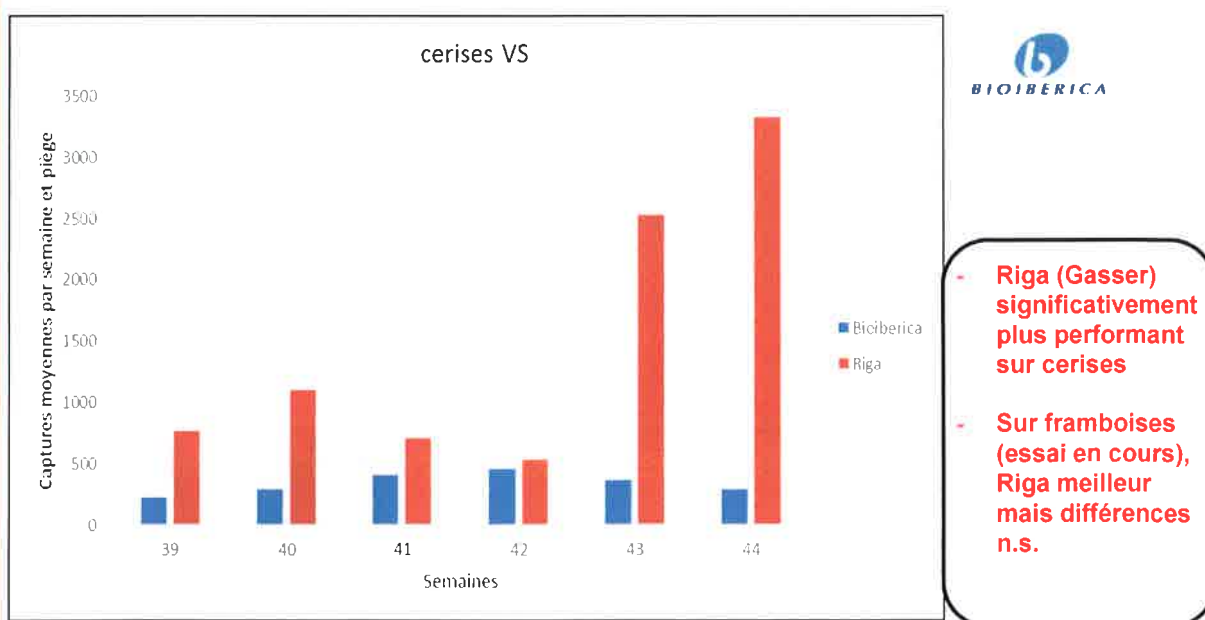


Essais chaux sur framboises: résultats



7

Comparaison d'attractifs sur cerises



8



Couleurs des pièges



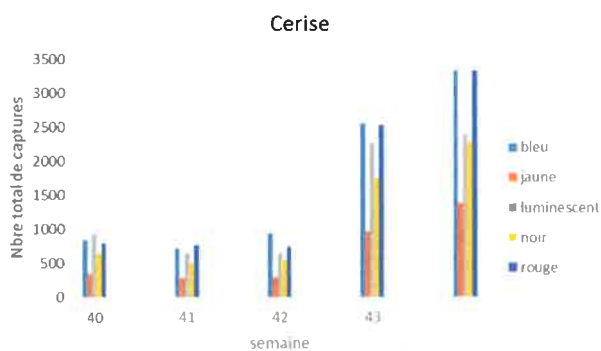
Journées *Drosophila suzukii* CTIFL Balandran 1er et 2 décembre 2016
C.A. Baroffio, S. Fischer: situation 2016 en Suisse

9

Agroscope



Couleurs des pièges

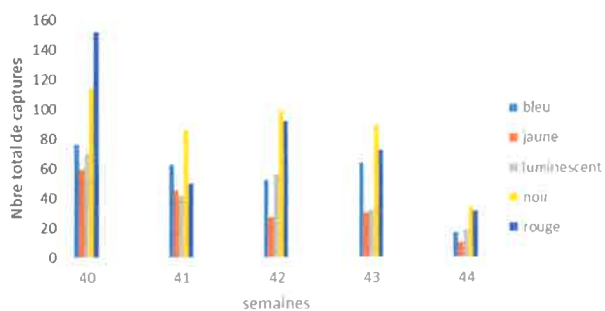


- Captures sur cerise > framboises

- Jaune le moins performant

- Réponses légèrement différentes en fonction des cultures

Framboises

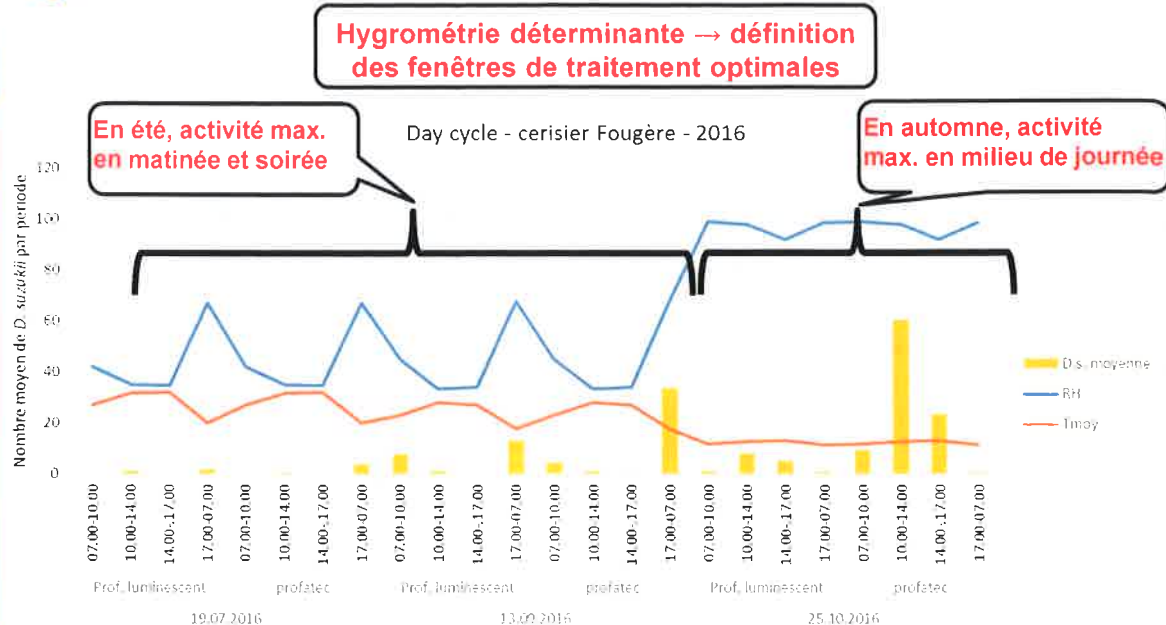


Journées *Drosophila suzukii* CTIFL Balandran 1er et 2 décembre 2016
C.A. Baroffio, S. Fischer: situation 2016 en Suisse

10

Agroscope

Approche du rythme nycthéral (par piégeage)

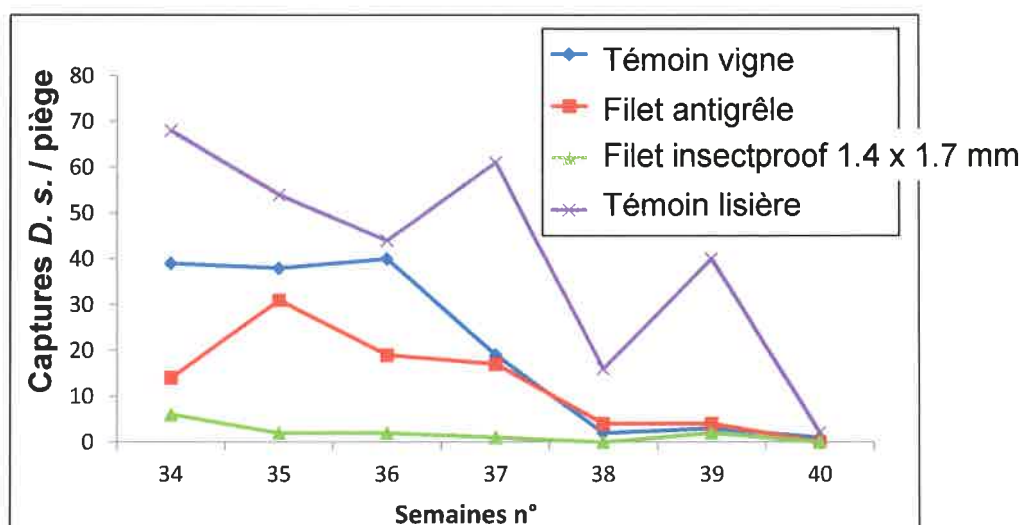


Journées *Drosophila suzukii* CTIFL Balandran 1er et 2 décembre 2016
C.A. Baroffio, S. Fischer: situation 2016 en Suisse

11

Essais filets (sur vigne)

(données Y. Cruchon, N.Stäheli, W. Siegfried, C.Cara)



Journées *Drosophila suzukii* CTIFL Balandran 1er et 2 décembre 2016
C.A. Baroffio, S. Fischer: situation 2016 en Suisse

12



Filets: Twann (Ct. Bern) – Worst-Case

3 cépages sensibles, environnement très favorable à *D.s.*



Filet bleu «Feudal»:
- fermé dessous et dessus
- mailles: 3.5 x 8mm
(mais filet très étirable →
mailles plus étroites)



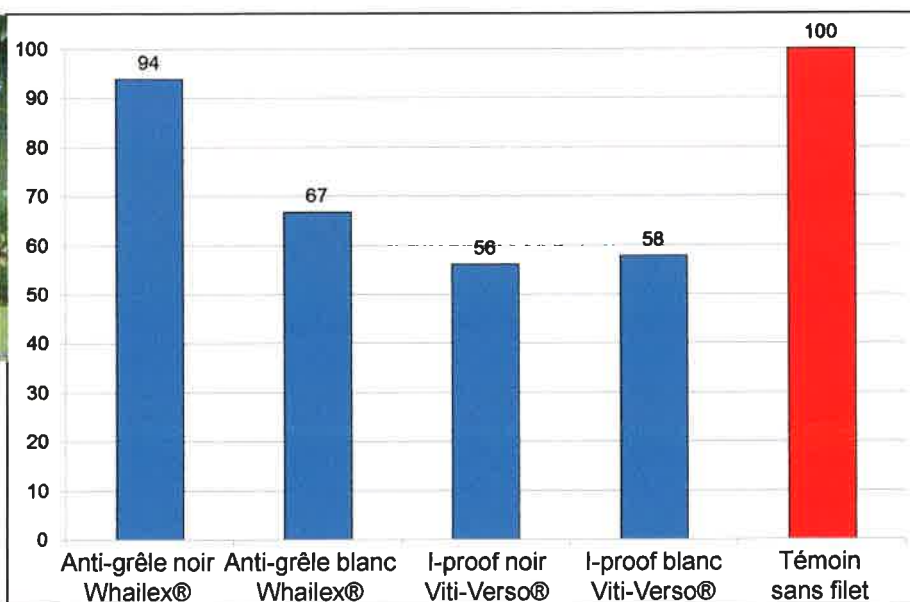
**Contrôle de 50 baies par cépage:
= aucune ponte observée sous le filet**

Journées *Drosophila suzukii* CTIFL Balandran 1er et 2 décembre 2016
C.A. Baroffio, S. Fischer: situation 2016 en Suisse

13



Effet des filets sur le dépôt de bouillie des pulvérisations (évaluation par bandes de papier sensible)



Journées *Drosophila suzukii* CTIFL Balandran 1er et 2 décembre 2016
C.A. Baroffio, S. Fischer: situation 2016 en Suisse

14

Situation 2016 pour la viticulture suisse

(resp. P. Kehrli et Ch. Linder)

Rappel

- 2014: année humide → microfissures sur les baies → forte occurrence de pourritures acétiques → attribuées à *D. suzukii* par les viticulteurs (inquiétude amplifiée par gros impact médiatico-politique)
- 2015: aucun problème...mais populations de *D.s.* plus faibles qu'en 2014 → les viticulteurs traitent, et/ou restent persuadés que *D.s.* est un grave ravageur de la vigne
- 2016: fortes populations de *D. s.*, mais climat favorable à la vigne en août –sept. → pas de microfissures sur les baies

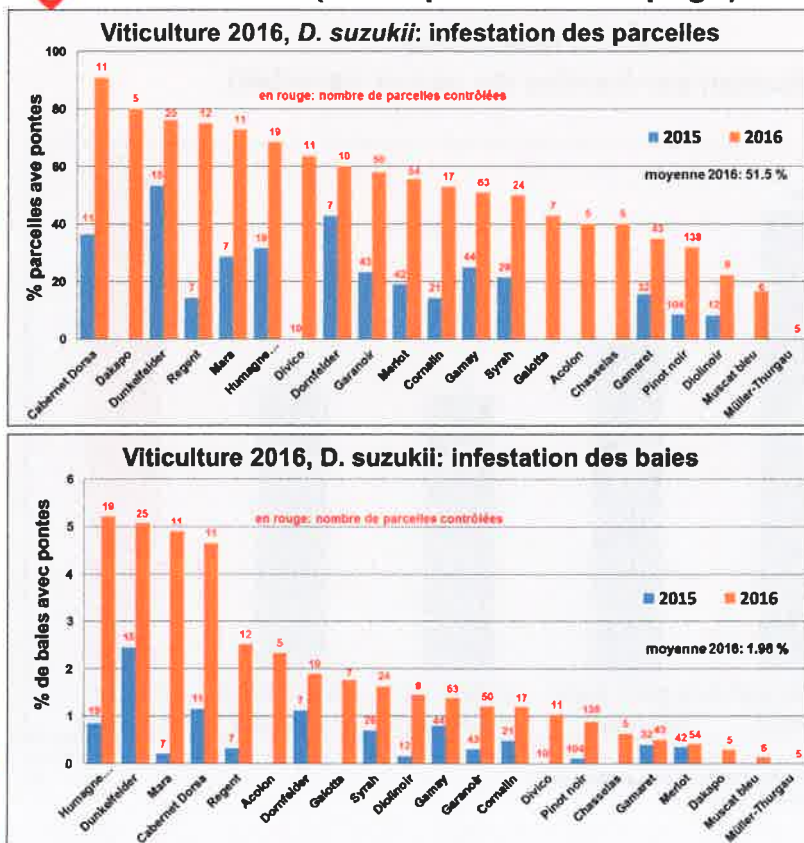
Monitoring 2016

- 600 parcelles
- 72 cépages
- ~150'000 baies contrôlées (dès début de la véraison)

Journées *Drosophila suzukii* CTIFL Balandran 1er et 2 décembre 2016
C.A. Baroffio, S. Fischer: situation 2016 en Suisse

15

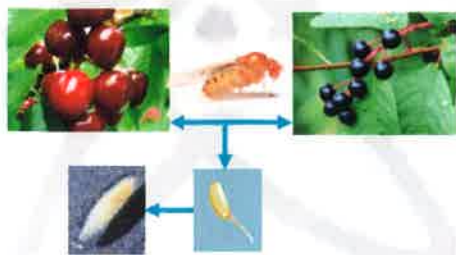
Résultats (dès 5 parcelles / cépage)



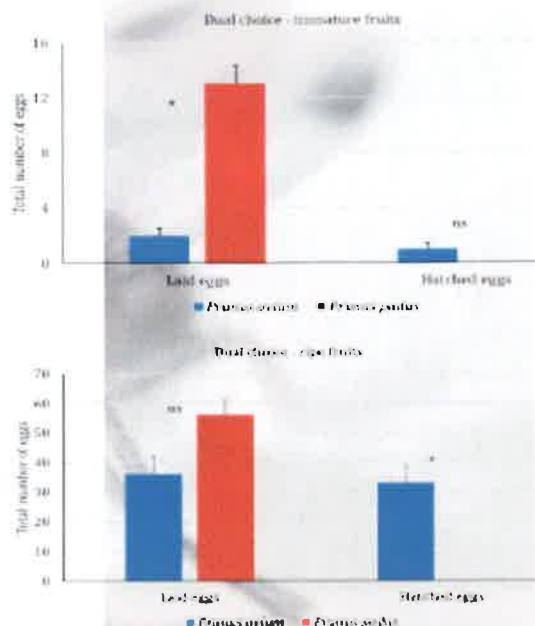
- Les taux de parcelles et de baies avec des pontes sont plus élevés qu'en 2015
- Les cépages les plus sensibles sont les mêmes qu'en 2015
- Mais très peu de cas de pourriture acétique en 2016
- Il se confirme qu'en Suisse, sauf cas exceptionnel de cépage très sensibles, la vigne n'est pas favorable au développement de *D.s.*



Info intéressante de pc fruit (B)



- Les baies du merisier à grappes (*Prunus padus*) sont très appréciées par *D.s.* pour la ponte, mais ne permettent pas le développement larvaire.
- D'implantation facile en haies, ce végétal pourrait servir de plante-piège dans une stratégie de «pull-push»
- Attention: dans le Trentino le cycle complet est observé dans les baies de *P. padus*...mais avec un faible % de réussite. (effet climat?)



Info de Tim Belien



Conclusions et perspectives

- Problèmes importants sur cerises et, pour la 1^{ère} fois, abricots
- Pas de dommages sur vigne
- Dans les baies, forte pression, mais peu de dégâts en cultures lorsque les stratégies recommandées ont été appliquées:
 - Surveillance
 - Piégeage massif
 - Filets (même uniquement sur parois des abris = bons résultats)
 - Traitements chimiques ou alternatifs en dernier recours
- Chaux en demande d'homologation comme substance de base
- 2017: tests de répulsifs combinés avec le piégeage



Merci de votre attention

Toute une équipe qui
travaille ensemble



DROSOPHILA SUZUKII MANAGEMENT ON CHERRY ORCHARDS IN EMILIA-ROMAGNA REGION (Northern Italy)

S. Caruso¹, G. Vaccari¹, M. Boselli², R. Tiso², S. Paolini³, G. Ceredi³, MG. Tommasini³

(1) *Consorzio Fitosanitario Provinciale di Modena*

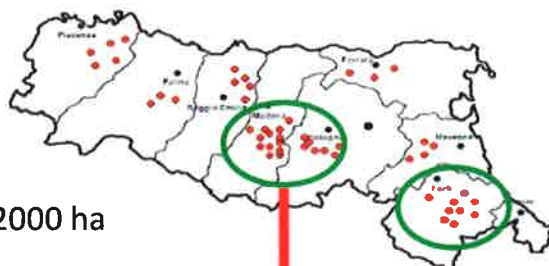
(2) *Servizio Fitosanitario, Regione Emilia-Romagna*

(3) *ASTRA, Centro Ricerche Produzioni Vegetali*



Journées Drosophila suzukii – Ctifl de Balandran 1 décembre 2016

CHERRIES IN EMILIA-ROMAGNA REGION



CULTIVATED AREA: 2000 ha
(Istat 2015)

TYPICAL CHERRY AREA OF VIGNOLA (Modena)



Surface: 1200 ha approximately
Average production/Year: 6000 Ton.

Harvest: 2 months (beginning of May– beginning of July)

*Protected Geographical
Indication (2012)*

MANAGEMENT OF *D.suzukii*

AFTER FIRST RECORD IN 2011

- Weekly monitoring on adults and fruits (egg laying)
- Weekly dissemination and recommendations for IPM and organic farming
- Research activities:
 - Traps and baits trials
 - Trials based on insecticide products
 - Mass trapping
 - Exclusion netting
- Partnership and collaboration with other Italian and European Institutions

Fondazione Mach – S. Michele Adige (Trento), Università di Padova, Università di Bologna, Università di Modena-Reggio E, Agrion – Piemonte, CTIFL – Nimes (FR), IRTA (E), Agroscope (CH).....

REGIONAL MONITORING

MONITORING OF ADULTS



Males of *D.suzukii*



Females of *D.suzukii*

Trap: Drosotrap®

Bait: Droskidrink® (¾ apple vinegar, 1¼ red vine + sugar)

MONITORING ON FRUITS



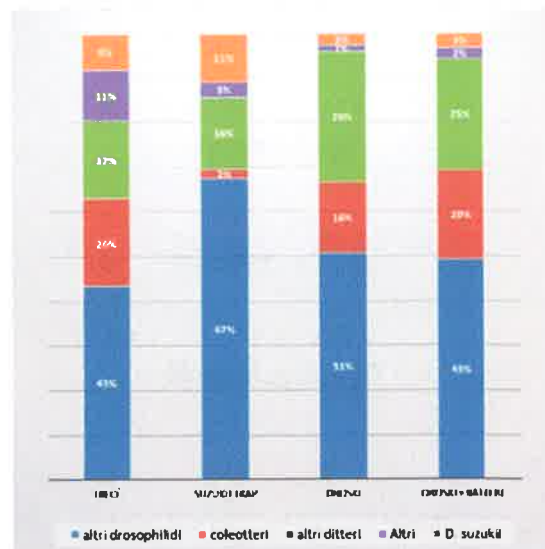
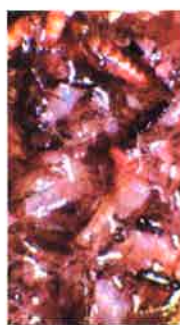
Verify egg laying

Annual monitoring (since 2011)

- 15-20 traps/week
- Sweet cherry fruits (100 fruits/week)
- Control on other stone fruits, grapevine
- Berries in mountain area (blackberries, blueberries, raspberries)

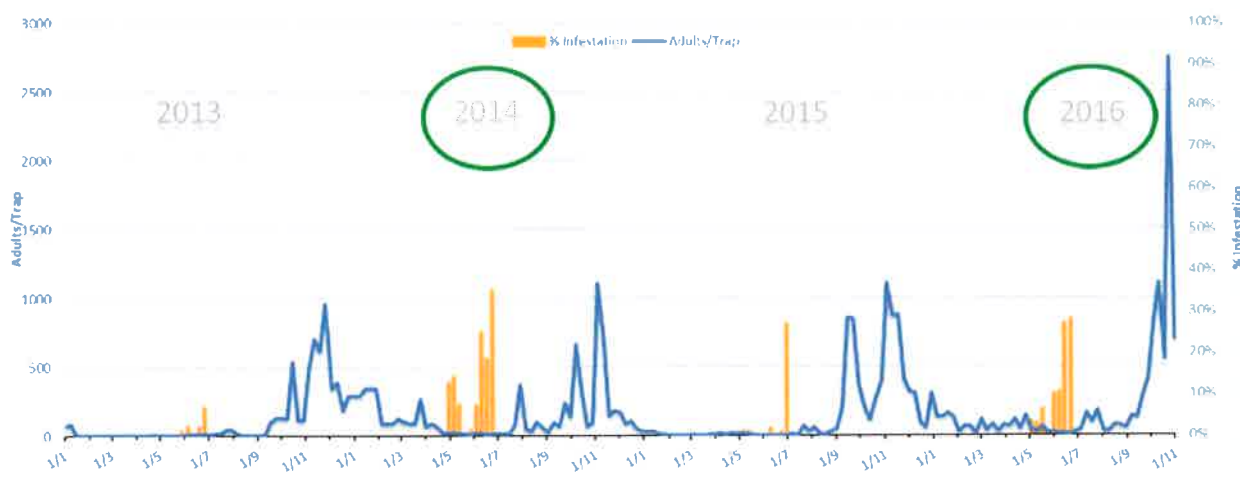
NEGATIVE ASPECTS OF THE TRAPS

LOW SELECTIVITY
FORMING OF CELLULOSE
SHORT PERIOD OF ACTIVITY (1 WEEK)



Selectivity of baits

SWD Monitoring Emilia-Romagna 2013-2016



Years with high level of damage: 2014 and 2016



Damage on blueberries (1700 m. altitude)

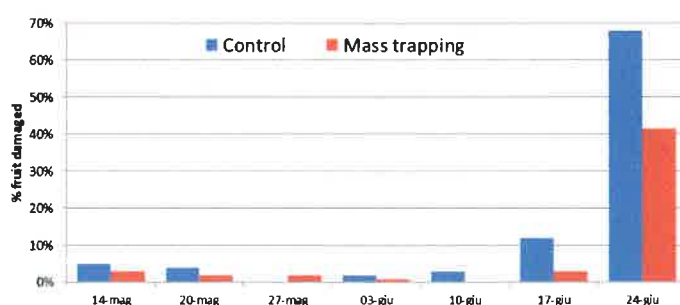


INSECTICIDES *D.suzukii* – 2016

Insecticides	Pre harvest interval (days)	Efficacy* (%)	Note
Spinosad	7	86,0	Organic farming
Spinetoram	10	83,4	Exceptional use (berries)
Deltamethrin	3/7	86,0	Allowed with derogation
Cyantranilprole	7	90,0	Exceptional use
<i>Phosmet</i>	<i>14</i>	<i>60,7</i>	<i>Phytotoxic on some cultivars</i>
<i>Dimethoate</i>	<i>14</i>	<i>83,6</i>	<i>Forbidden 2016</i>

* Average of 8 trials between 2013 - 2016

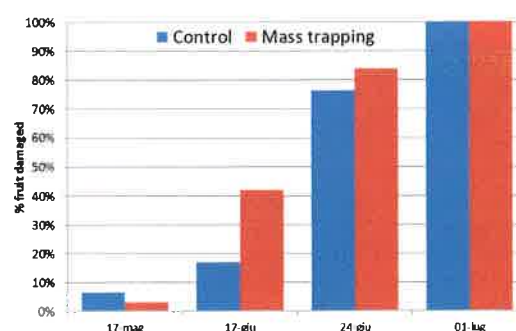
TRIALS ON MASS TRAPPING (2014)



Center of the field

Control and mass trapping with insecticides

Field borders



- *Laborious work*
- Increased damage on borders

Not applicable

EXCLUSION NETTING

1- WHOLE ORCHARD
(Adjustment of anti-rain covers)



2- SINGLE ROW



Top with double net
(anti-rain function)

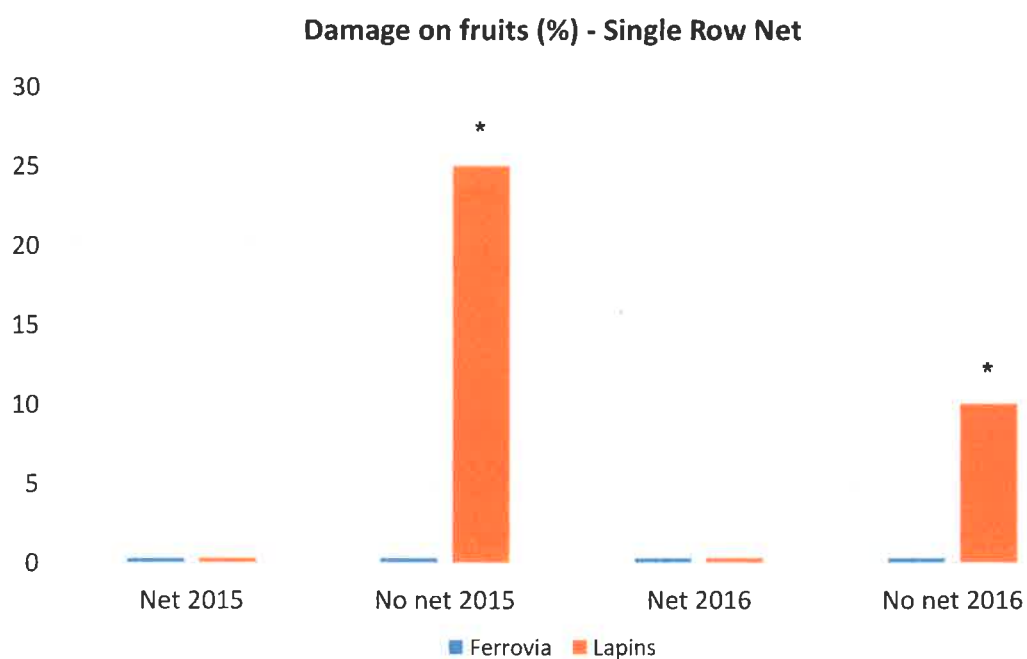
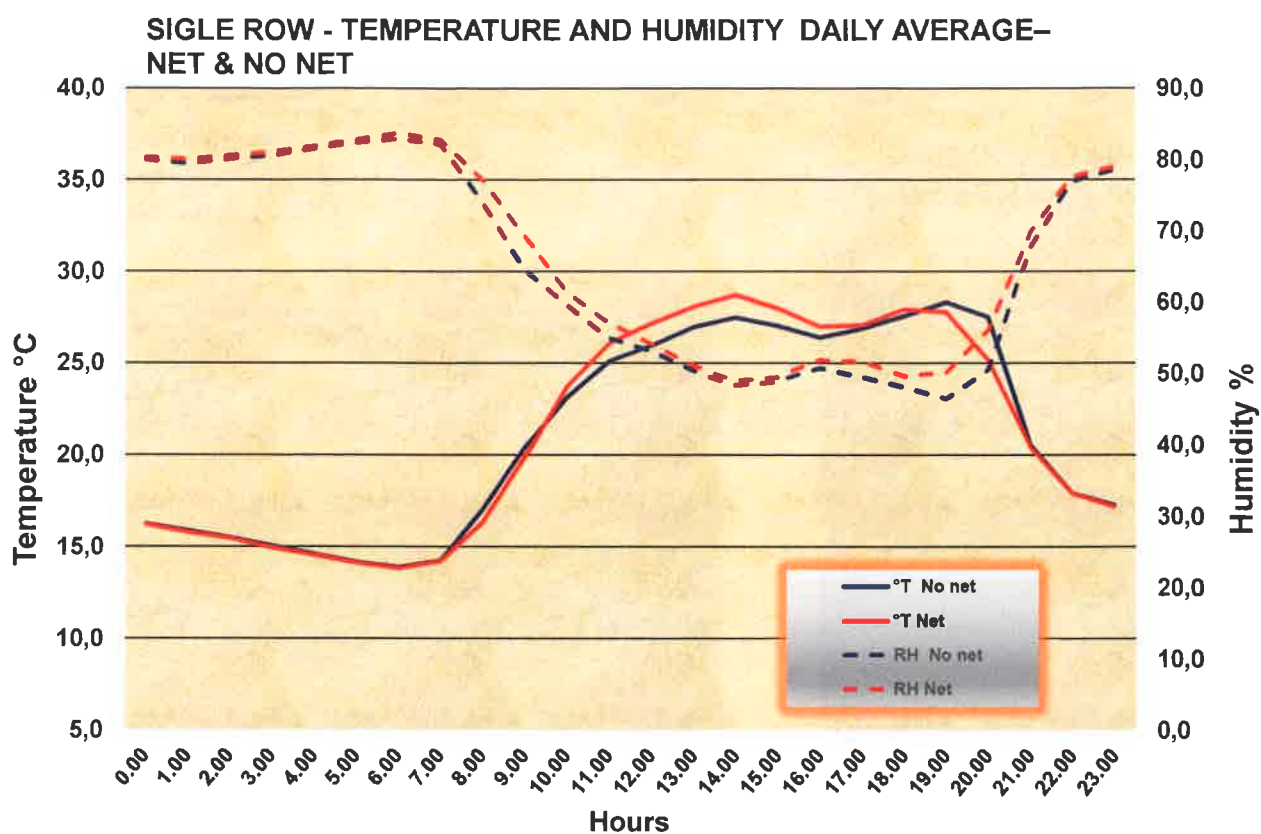
Net 6x9: mesh size mm (0,75x1,40) = 1,1 mm²

WHOLE ORCHARD NET

- Uncomplete efficacy, need of supplementary treatments
- Lower costs of adjustment (1000 euro/ha)
- Difficulties on the management of larger orchards and on bigger trees
- Increase of T ° and RH in warmer years creates unpleasant environment for operators (inside)

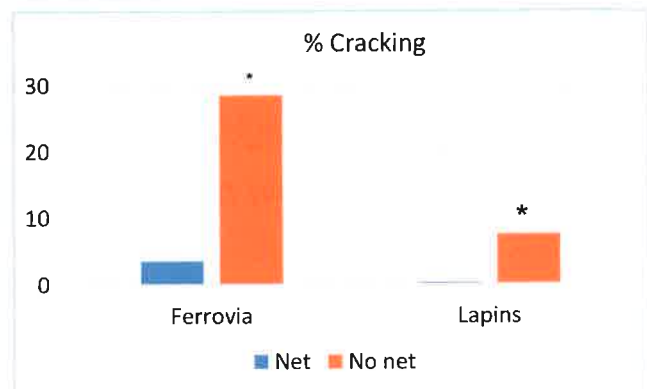
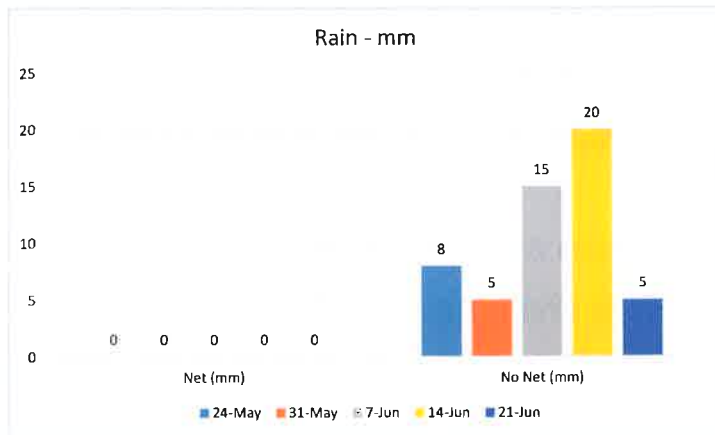
SINGLE ROW NET

- Total efficacy but higher costs of the system (40.000-50.000 €/ha)
- Anti-rain protection, good control on European cherry fruit fly, birds and hail
- No negative effects on microclimate, good quality of production
- Possibility of external pesticide application (lower speed of atomizer)
- Selective application in orchard (eg. only on late or sensitive cultivars)



No net: 4 insecticides treatments (spinosad, deltamethrin, cyantranilprole)
 Net: no insecticides

RESULTS – Single row net: rain and cracking 2016



Tukey test (*) $p < 0,05$

ONGOING RESEARCH

- Development of a forecasting model
- New traps and baits with higher efficacy (persistence, attractivity, selectivity, no cellulose)
- Attract&Kill
- Further studies on exclusion netting efficacy and economic sustainability
- Evaluations on new insecticides
- Genetical studies of SWD resistance to insecticides
- Biological control with release of native parasitoids (*Trichopria drosophilae*)

CONCLUSIONS

- In Emilia-Romagna Region, the most susceptible crops are sweet cherry and berries,
- other stone fruits and grapevine do not show significant damage.
- Monitoring of adults and fruits is challenging but is it useful tool to understand the field situation and to recommend the appropriate use of insecticides and of others techniques.
- Presently the control of *D.suzukii*, is achieved by using insecticides, whit negative coonsequences (environmental impact, waste management, incomplete efficacy)
- The use of single row nets is promising and gradually increasing

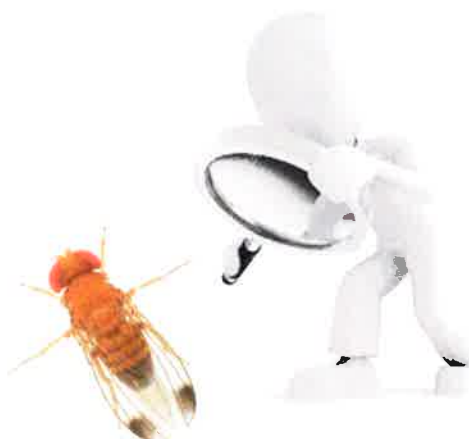
*The problems caused by D.suzukii are yet unsolved:
It is necessary, but not easy, to identify sustainable solutions !!*

Merci, Thank you, Grazie !!



This study was funded by Fondazione di Vignola and by Emilia Romagna region (within the Rural Development Plan, Measure 16 and coordinated by CRPV). The authors are thankful for this financial support

The management of *Drosophila suzukii*, key pest of soft fruits in Trentino, Northern Italy



A.Grassi, A.Gottardello, G.Ganarin, S.Franchini, S.Conci, P.Miorelli, P.Zucchi, V.R.Stacconi, T.Pantezzi
E.Mach Foundation/Technology Transfer Centre, S.Michele all'Adige, Trento (IT)

1-2/12/2016 Journées *Drosophila suzukii* - Centre Ctifi de Balandran (F)

Technology Transfer Centre



The control of *Drosophila suzukii* on soft fruits in Trentino still relies on the combination within an Integrated Pest Management plan of:

- Territorial monitoring of the pest (adults flight and fruits infestation) – FEM alert service for the growers
- Area-wide application of preventative and sanitation measures
- Habitat manipulation
- Mass trapping
- Anti-insect nets
- Insecticides applications

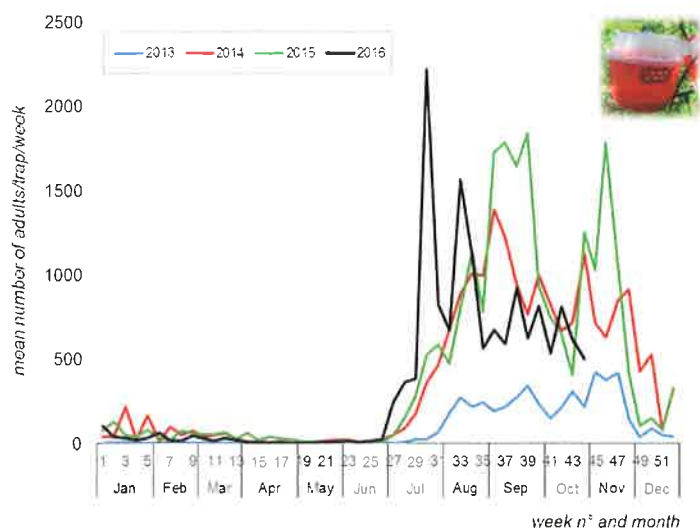
1-2/12/2016 Journées *Drosophila suzukii* - Centre Ctifi de Balandran (F)

Technology Transfer Centre

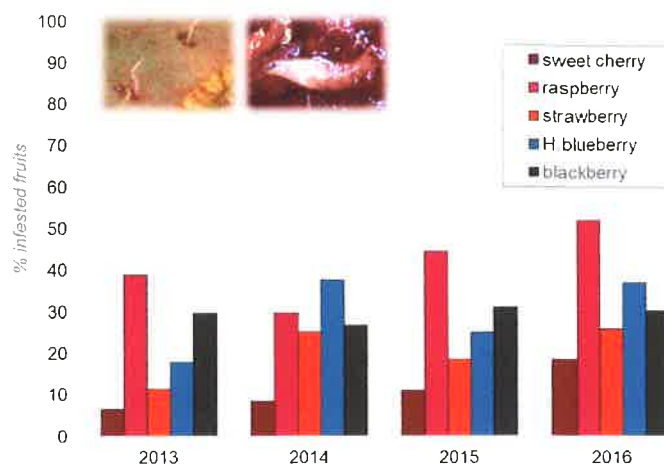


Territorial monitoring

D.szukii adults catches with Droskidrink baited traps



Seasonal *D.szukii* infestation on sweet cherry and soft fruits



1-2/12/2016

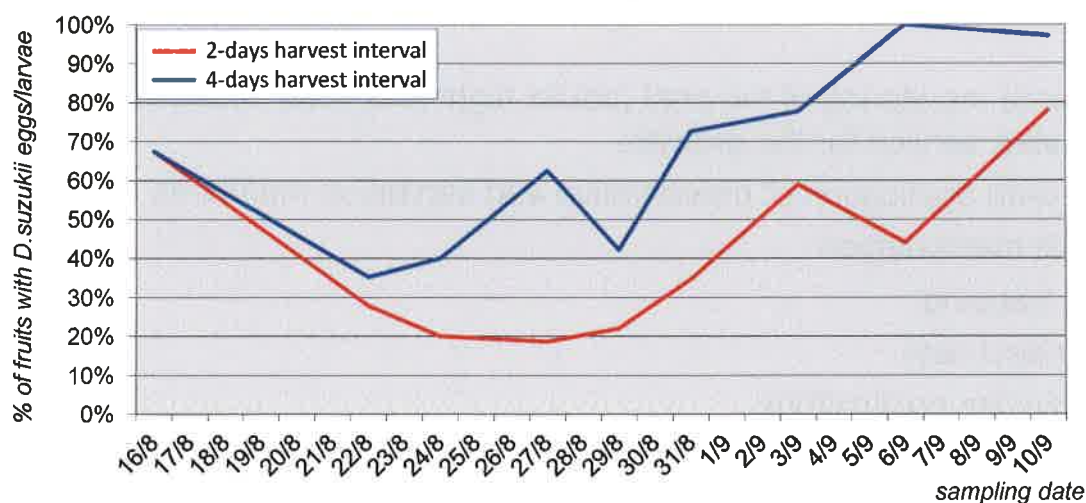
Journées *Drosophila suzukii* - Centre Ctifl de Balandran (F)

Technology Transfer Centre



Preventative and sanitation measures

Effect of a short harvest interval on the control of *D.szukii* damage on primocane-fruiting red raspberry



«The longer is the interval, the higher is the damage»

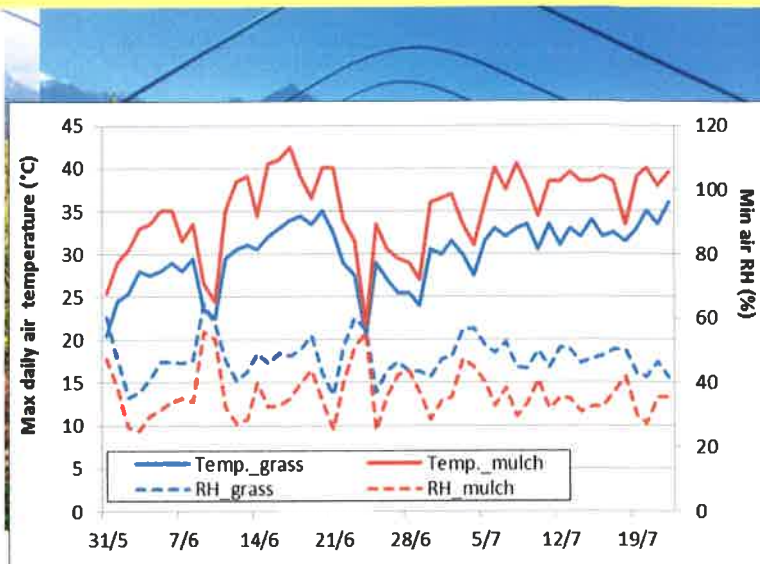
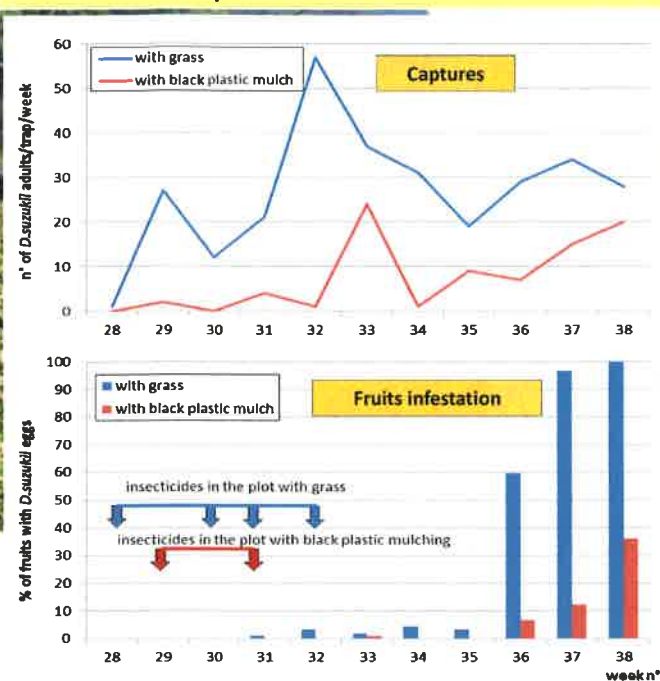
1-2/12/2016

Journées *Drosophila suzukii* - Centre Ctifl de Balandran (F)

Technology Transfer Centre

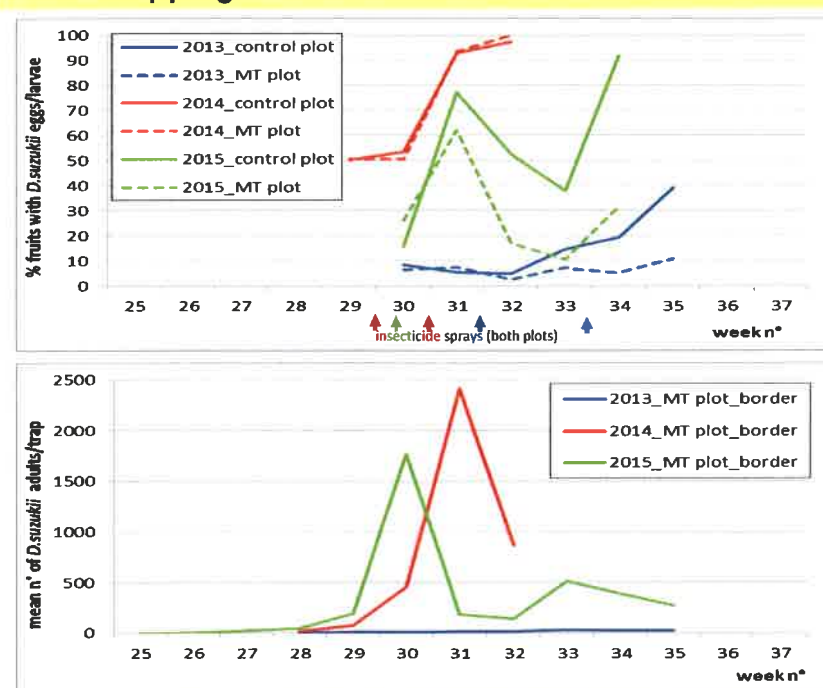


Habitat manipulation



«The black plastic mulching promotes a hot/dry microclimate, negative for *D. suzukii* development»

Mass trapping



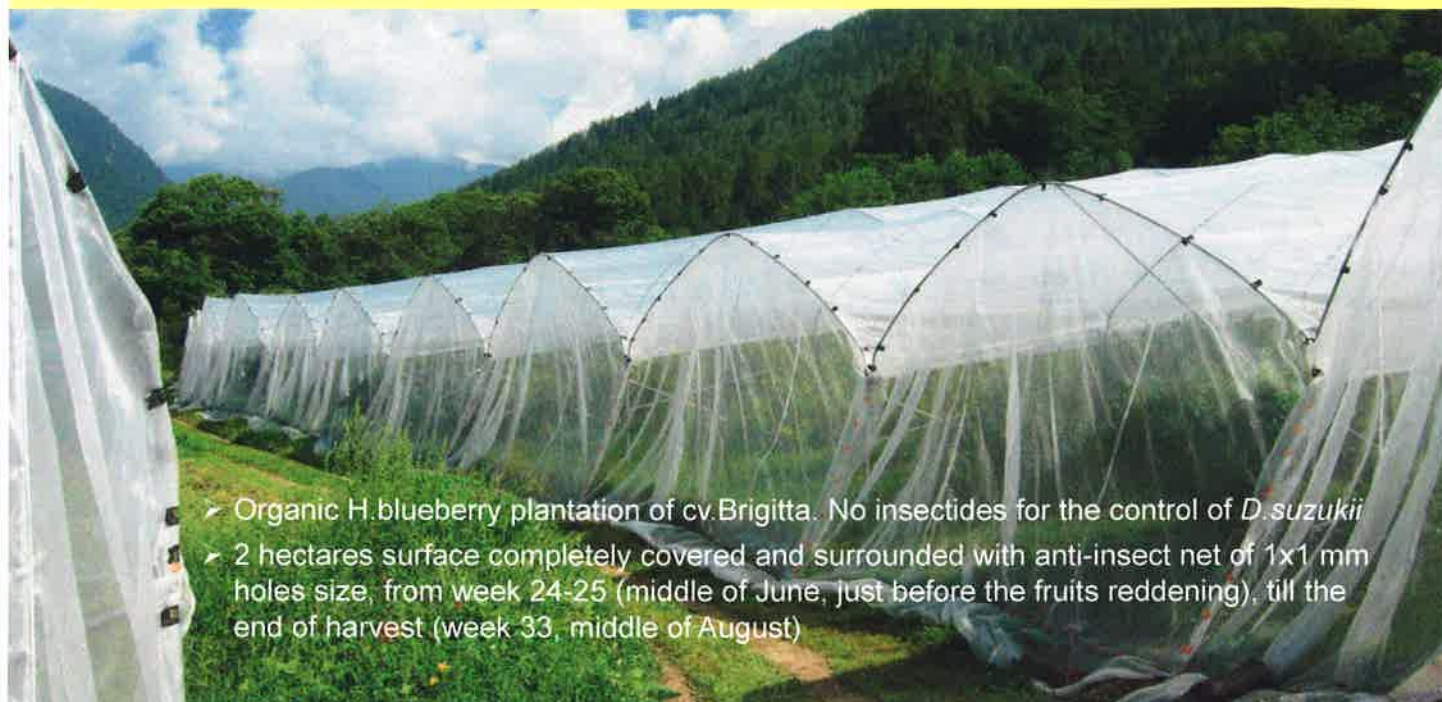
2014: about 32,000 adults in a single trap along the wood margin at week 31



	avg. % efficacy	max % efficacy
2013	38.4	72
2014	0.5	5.8
2015	32	72.6

«Extremely variable efficacy: better results where (environment) and when (season, period) the pest has a low-medium demographic pressure»

Anti-insect nets



- Organic H. blueberry plantation of cv. Brigitta. No insecticides for the control of *D. suzukii*
- 2 hectares surface completely covered and surrounded with anti-insect net of 1x1 mm holes size, from week 24-25 (middle of June, just before the fruits reddening), till the end of harvest (week 33, middle of August)

1-2/12/2016

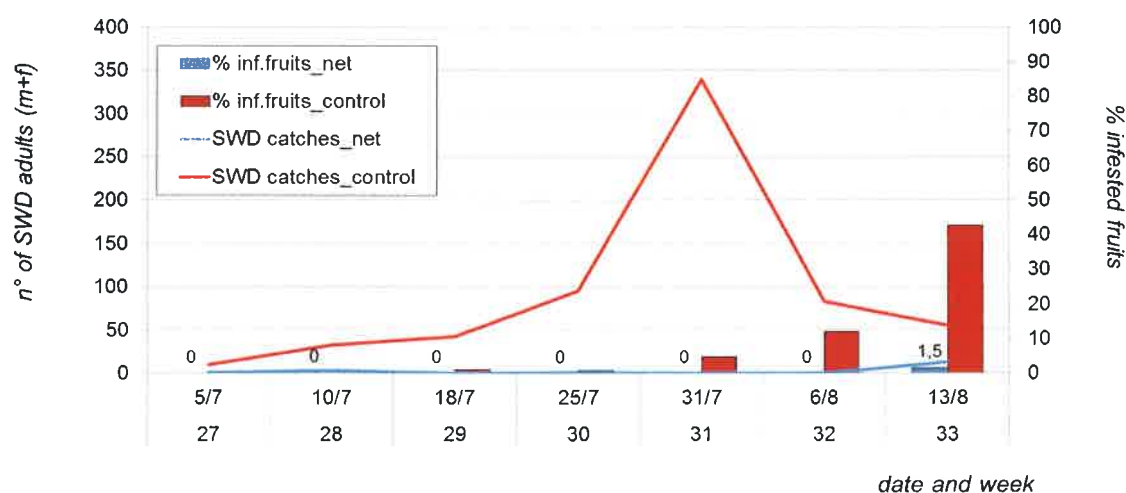
Journées *Drosophila suzukii* - Centre Ctifl de Balandran (F)

Technology Transfer Centre



Anti-insect nets

D. suzukii infestation in an organic H. blueberry field (cv. Brigitta)
protected with exclusion net (1x1 mm hole size) - Valsugana, Trentino



«The exclusion nets are currently the most effective method to limit the damages, provided that they are managed very carefully»

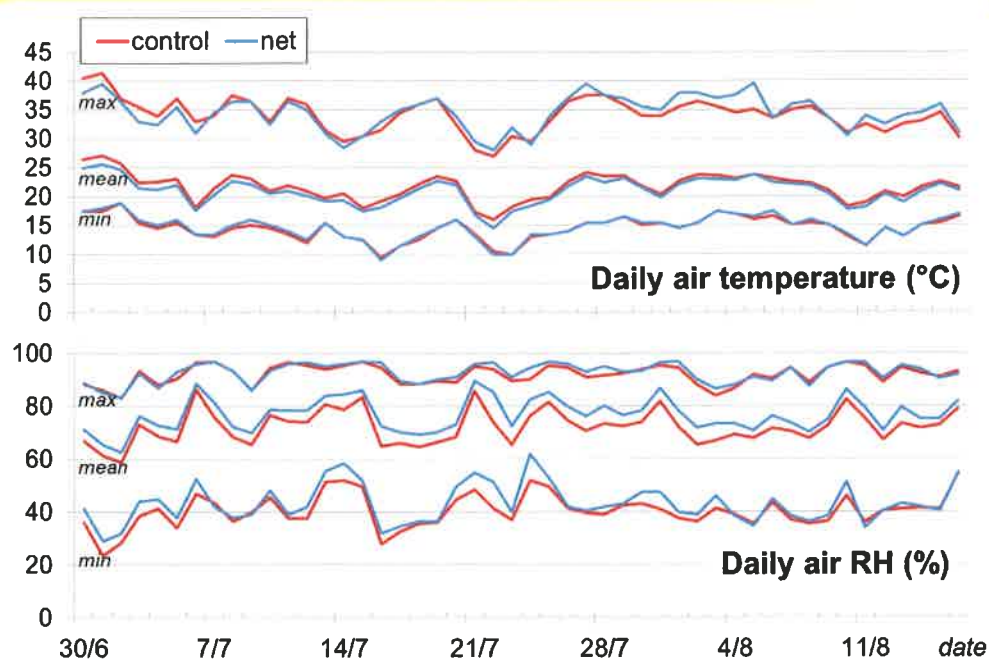
1-2/12/2016

Journées *Drosophila suzukii* - Centre Ctifl de Balandran (F)

Technology Transfer Centre



Anti-insect nets

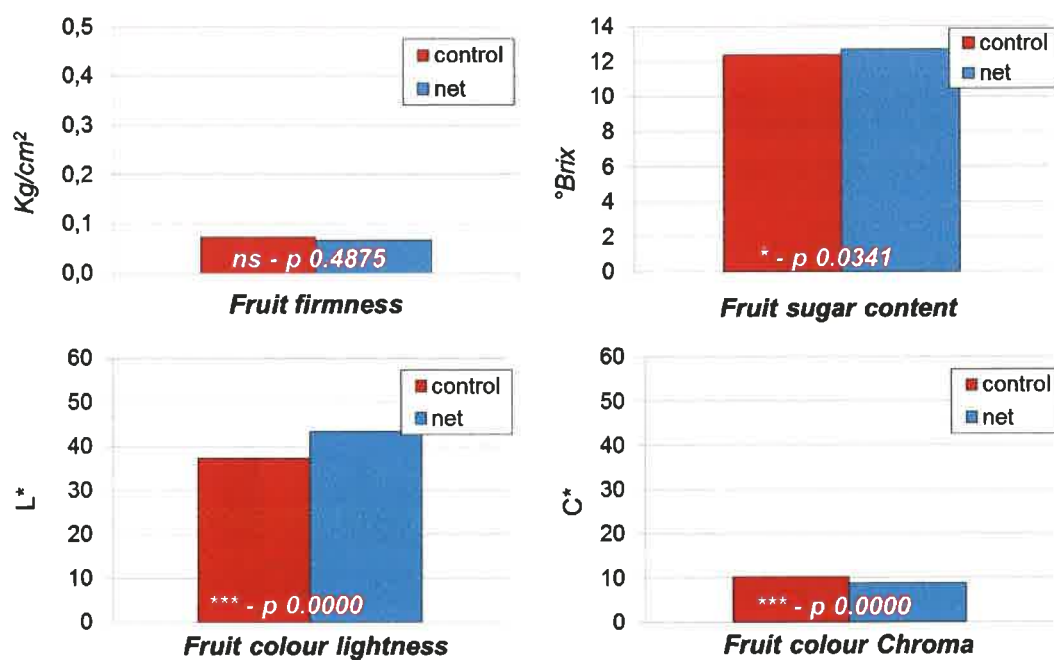


1-2/12/2016 Journées *Drosophila suzukii* - Centre Ctifi de Balandran (F)

Technology Transfer Centre



Anti-insect nets



ANOVA $p < 0.05$

1-2/12/2016 Journées *Drosophila suzukii* - Centre Ctifi de Balandran (F)

Technology Transfer Centre



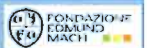
Insecticides

Insecticides specifically registered in Italy against *Drosophila suzukii* on strawberry and soft fruits in 2016

Active ingredient	Commercial formulations	Crops	PHI (days)	Notes, restrictions	Derogation license
pyrethrins	Piretro Verde	strawberry, raspberry, blackberry	2	max 3 sprays (on raspberry and blackberry)	Ministerial Decree 03/8/2016: from 03/8 till 01/12/2016
spinetoram	Delegate TM 2016	raspberry (in glasshouse)	7	max 2 sprays at 15 days min. interval	Ministerial Decree 23/5/2016: from 01/6 till 28/09/2016
deltamethrin	Decis Evo	raspberry, blackberry (in glasshouse)	7	max 2 sprays at 7 days min. interval	Ministerial Decree 16/8/2016: from 16/8 till 13/12/2016
fosmet	Spada 50 WG	blueberry	5	max 1 spray/year	Ultimately registration 21/7/2016: from 21/7 till 31/07/2019

1-2/12/2016 Journées *Drosophila suzukii* - Centre Ctif de Balandran (F)

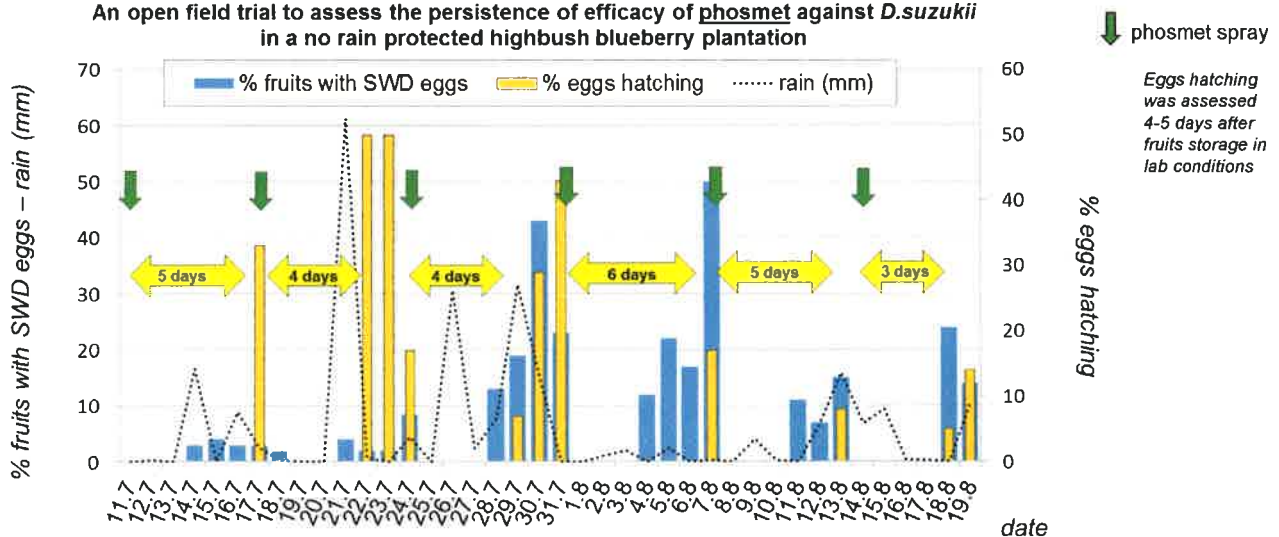
Technology Transfer Centre



Insecticides

The real problem is not «how many insecticides do we have ?» but «what kind of efficacy can we expect to have from them ?»

An open field trial to assess the persistence of efficacy of phosmet against *D.suzukii* in a no rain protected highbush blueberry plantation



In this open field conditions, phosmet showed to completely devitalize *D.suzukii* eggs for a period after the treatment of 4-4.5 days on average

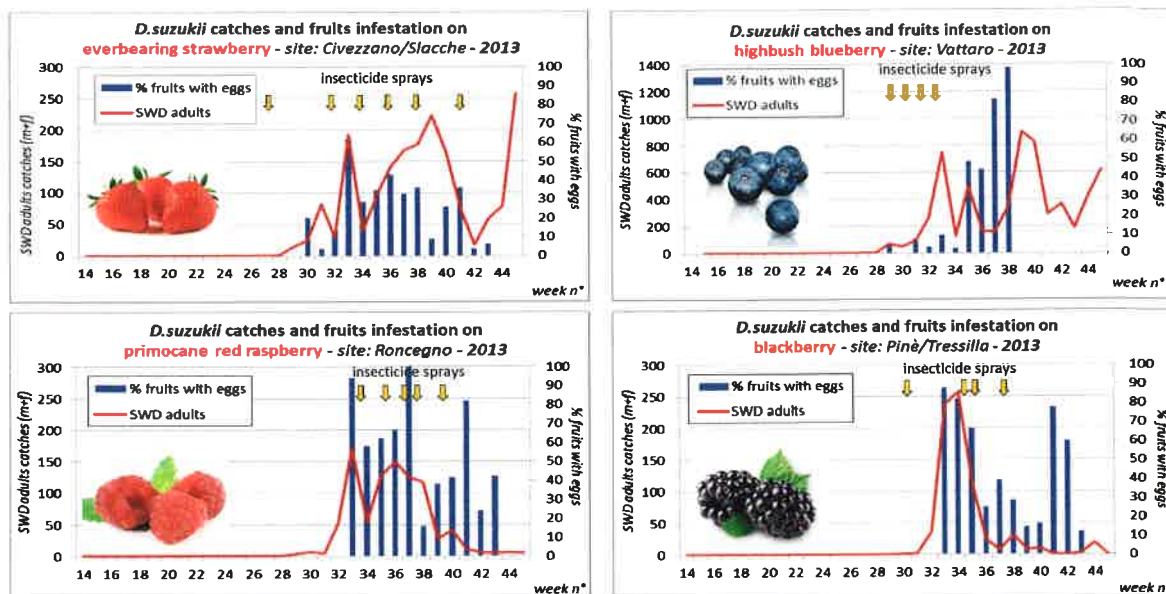
1-2/12/2016 Journées *Drosophila suzukii* - Centre Ctif de Balandran (F)

Technology Transfer Centre



Insecticides

The efficacy level of these insecticides in field situations is always questionable and extremely variable (low reliability !)



Other research and experimentation topics on *Drosophila suzukii* at FEM

- **Traps/baits:** development and comparison of different models, studies on volatiles emitted by fruits and lures
- **Behavioural studies:** overwintering, validation of phenological models, spreading of the adults on the territory, factors promoting the infestations
- **Parasitoids:** rearing and evaluation in semi-field and field trials of resident and commercial species
- **Morphology and genetic:** studies on the populations
- **Wolbachia bacteria:** studies on the presence and role in the local populations
- **Insecticides:** evaluation of registered and new compounds in lab and open field trials
- **Alternative control methods:** attract and kill, alternative insecticides distribution systems, organic compounds, repellents
- **Wine grape:** monitoring, cultivar susceptibility, possibilities of infestation control

Many thanks for
your attention !



ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful also to our colleagues Linda Carlin, Manuel Failo, Massimo Pezzè, Luisa Mattedi, Flavia Forno, Romano Maines, Gaja Bostani, Marino Gobber, to Lorenzo Tonina (University of Padova), Gianluca Groff, to LEXEM project and to all the growers of Sant'Orsola Soft Fruit Growers Association who supplied us with the orchards for our trials

1-2/12/2016

Journées *Drosophila suzukii* - Centre Ctifl de Balandran (F)

Technology Transfer Centre

FONDAZIONE
EDMUNDO
MACHI



Point de la situation *Drosophila suzukii* en France en 2016

Yannie Trotter, Claire Weydert - Ctifi

Journées *Drosophila suzukii*

1^{er} et 2 décembre 2016



Point de la situation 2016

- Fortes captures en hiver et peu de froid (situation identique à 2015)
- Conditions climatiques printanières favorables au développement de *D. suzukii* (*fraicheur et humidité*)
- Conditions climatiques estivales variables et plutôt favorables au développement de *D. suzukii* (sauf zone méditerranéenne, climat chaud et sec).
- Les attaques sur les cultures non traitées sont révélatrices de la forte pression de *D. suzukii*.
- Sur petits fruits la prophylaxie permet en général de retarder et limiter les dégâts





Remontée d'informations

- BSV
- Tableau partagé *D. suzukii*
- Groupe de travail national *D. suzukii* animé par le Ctifl
- Contacts ponctuels, autres réunions techniques...



situation *D. suzukii* 2012 à 2016

n° de situation	Date	Auteur	Région	Département	Culture	Support	Commentaire
1	15/10/2015	JF Mandon	LR	30	Bellegarde	Cassis	Résultats de more 1er comptage de dégâts 5 Pré-vendange de fraise le 5 mai culture 2 (pro- - Parcelle traitée avec 1 Spasol le 4 mai les 2 derniers relevés) - Parcelle non traitée plus tardive, lessive de captures (130 par ha) sur les 2 derniers r- - parcelles non traitées plus tardive, lessive de captures (130 par ha) sur les 2 derniers r- - parcelles non traitées plus tardive, lessive de captures (130 par ha) sur les 2 derniers r-
2	15/10/2015	JF Mandon	LR	30	Bellegarde	Cassis	Résultats de more 1er comptage de dégâts 5 Pré-vendange de fraise le 5 mai culture 2 (pro- - Parcelle traitée avec 1 Spasol le 4 mai les 2 derniers relevés) - Parcelle non traitée plus tardive, lessive de captures (130 par ha) sur les 2 derniers r- - parcelles non traitées plus tardive, lessive de captures (130 par ha) sur les 2 derniers r- - parcelles non traitées plus tardive, lessive de captures (130 par ha) sur les 2 derniers r-
3	15/10/2015	JF Mandon	LR	30	Bellegarde	Cassis	Résultats de more 1er comptage de dégâts 5 Pré-vendange de fraise le 5 mai culture 2 (pro- - Parcelle traitée avec 1 Spasol le 4 mai les 2 derniers relevés) - Parcelle non traitée plus tardive, lessive de captures (130 par ha) sur les 2 derniers r- - parcelles non traitées plus tardive, lessive de captures (130 par ha) sur les 2 derniers r- - parcelles non traitées plus tardive, lessive de captures (130 par ha) sur les 2 derniers r-
4	15/10/2015	JF Mandon	LR	30	Bellegarde	Cassis	Résultats de more 1er comptage de dégâts 5 Pré-vendange de fraise le 5 mai culture 2 (pro- - Parcelle traitée avec 1 Spasol le 4 mai les 2 derniers relevés) - Parcelle non traitée plus tardive, lessive de captures (130 par ha) sur les 2 derniers r- - parcelles non traitées plus tardive, lessive de captures (130 par ha) sur les 2 derniers r- - parcelles non traitées plus tardive, lessive de captures (130 par ha) sur les 2 derniers r-
5	15/10/2015	JF Mandon	LR	30	Bellegarde	Cassis	Résultats de more 1er comptage de dégâts 5 Pré-vendange de fraise le 5 mai culture 2 (pro- - Parcelle traitée avec 1 Spasol le 4 mai les 2 derniers relevés) - Parcelle non traitée plus tardive, lessive de captures (130 par ha) sur les 2 derniers r- - parcelles non traitées plus tardive, lessive de captures (130 par ha) sur les 2 derniers r- - parcelles non traitées plus tardive, lessive de captures (130 par ha) sur les 2 derniers r-
6	20/10/2015	S. Ballon	IdV Pyr	32	Montauban	Cassis	Résultats de more 1er comptage de dégâts 5 Pré-vendange de fraise le 5 mai culture 2 (pro- - Parcelle traitée avec 1 Spasol le 4 mai les 2 derniers relevés) - Parcelle non traitée plus tardive, lessive de captures (130 par ha) sur les 2 derniers r- - parcelles non traitées plus tardive, lessive de captures (130 par ha) sur les 2 derniers r- - parcelles non traitées plus tardive, lessive de captures (130 par ha) sur les 2 derniers r-
7	17/05/2016	A. De-Régis	ALPC	19	Framboise	Cassis	Résultats de more 1er comptage de dégâts 5 Pré-vendange de fraise le 5 mai culture 2 (pro- - Parcelle traitée avec 1 Spasol le 4 mai les 2 derniers relevés) - Parcelle non traitée plus tardive, lessive de captures (130 par ha) sur les 2 derniers r- - parcelles non traitées plus tardive, lessive de captures (130 par ha) sur les 2 derniers r- - parcelles non traitées plus tardive, lessive de captures (130 par ha) sur les 2 derniers r-
8	20/10/2015	C. CHEVRIER	AURA	68	St Laurent d'Agny	hais-vendange	Résultats de more 1er comptage de dégâts 5 Pré-vendange de fraise le 5 mai culture 2 (pro- - Parcelle traitée avec 1 Spasol le 4 mai les 2 derniers relevés) - Parcelle non traitée plus tardive, lessive de captures (130 par ha) sur les 2 derniers r- - parcelles non traitées plus tardive, lessive de captures (130 par ha) sur les 2 derniers r- - parcelles non traitées plus tardive, lessive de captures (130 par ha) sur les 2 derniers r-



Point de la situation 2016

Cerise

Attaques précoces, dès les premières variétés de cerises dans le sud de la France (mi-mai) et pression globalement élevée pendant toute la récolte. Localement, explosion des dégâts fin juin-juillet malgré la protection chimique (surtout PACA, Rhône-Alpes).

Autres fruits

Signalement de dégâts sur abricot et pêche (surtout Rhône-Alpes) dès début juillet.

Petits fruits

Situation généralement maîtrisée sur fraise et framboise (prophylaxie et traitements). Dégâts localement importants dès fin-avril (PACA-06), et à partir de juin-juillet (Auvergne, Rhône-Alpes, Aquitaine, Limousin).

Intensification des dégâts sur les récoltes tardives à partir d'août-septembre.





Merci de votre attention!

Témoignage coopérative Sicoly



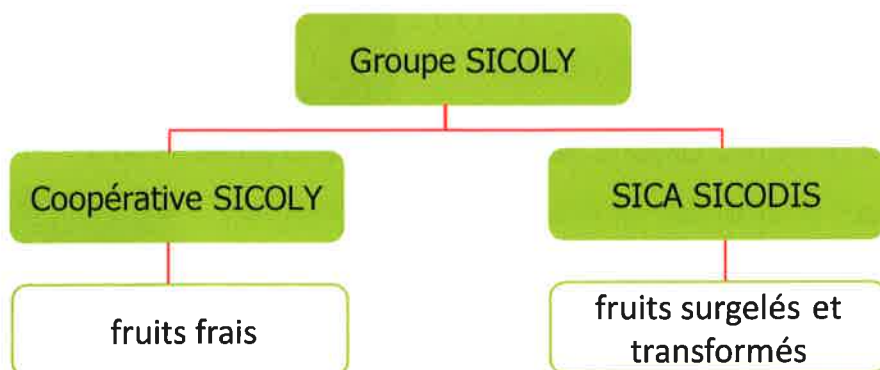
Aline FONS, Conseillère de culture
arboriculture et petits fruits

Journées *Drosophila suzukii* 1^{er} et 2 décembre 2016

1

COOPERATIVE SICOLY

Depuis 1962, au nord de la vallée du Rhône,
dans les Coteaux et Monts du Lyonnais



100
PRODUCTEURS



500
HECTARES

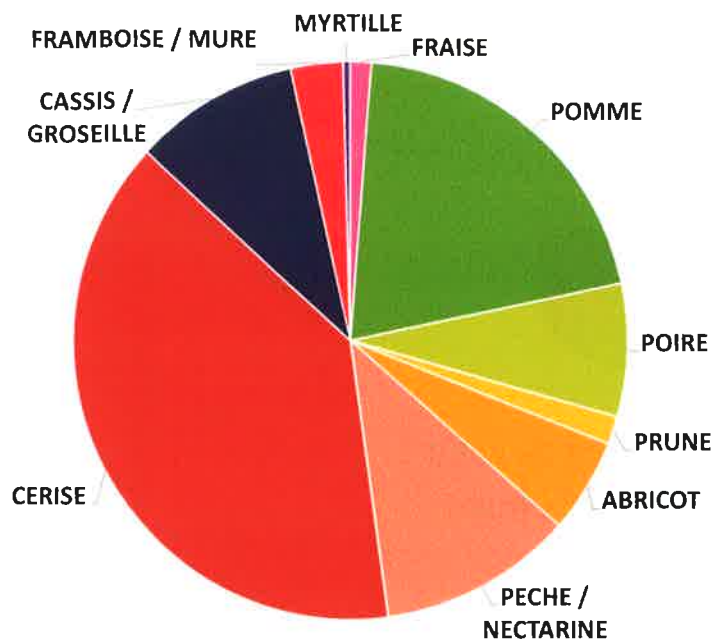


10000
TONNES DE
FRUITS FRAIS/AN

Journées *Drosophila suzukii* 1^{er} et 2 décembre 2016

2

Répartition des productions / espèce :



Exploitations
familiales
plein champ,
sous tunnels
ou hors-sol

Pluviométrie
annuelle :
800 mm

T°C max
estivales : 33°C
(35 °C juillet 2015)

100
PRODUCTEURS

500
HECTARES

10000
TONNES DE
FRUITS FRAIS/AN

Journées Drosophila Suzuki 1^{er} et 2 décembre 2016

3

Surveillance

Dispositif de suivis par piégeage :

- suivis hebdomadaires en saison
 - MURE, MYRTILLE, FRAMBOISE, FRAISE, CERISE...
et environnement proche (bois, haies)
 - Couverture secteurs COTEAUX LYONNAIS 360m et MONTS DU LYONNAIS 660 m
- suivi hivernal bimensuel (framboise et environnement proche)
 - 2 producteurs de petits fruits (1 COTEAUX et 1 MONTS DU LYONNAIS).

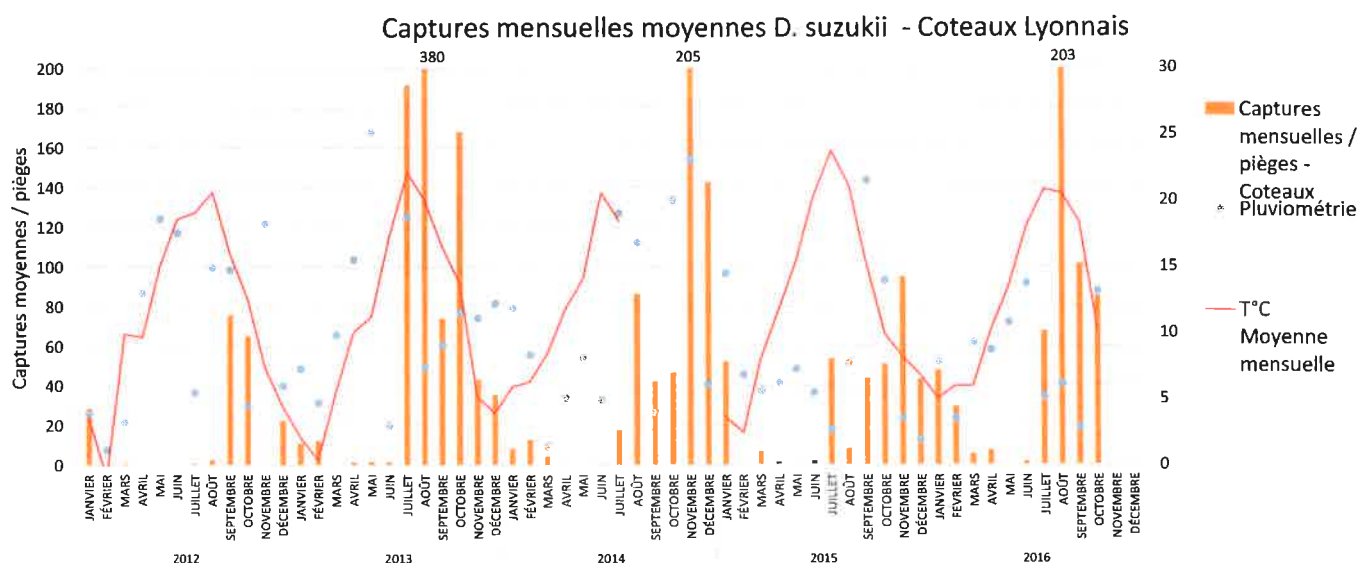


1 type de piège et attractif → homogénéisation données pluri annuelles

Journées Drosophila Suzuki 1^{er} et 2 décembre 2016

4

Surveillance



Journées *Drosophila suzukii* 1^{er} et 2 décembre 2016

5

Des producteurs sensibilisés...

- Bulletin info hebdomadaire du réseau de surveillance
- Réunions d'information et de stratégie avec partenaires de recherche (CNRS, Agroscope, Ctifl...)
- Echanges techniques France et Etranger
- Mise en place de méthodes de lutttes alternatives sur les exploitations



Journées *Drosophila suzukii* 1^{er} et 2 décembre 2016

6

...des producteurs impliqués !

Prophylaxie systématique :

- Sols propres
- Limitation hygrométrie proche récolte
- Pièges de surveillance

En petits fruits :

- Récoltes rapprochées (2-3 j fraise/framboise, 4-5 j mûre/myrtille)
- Filets insecte proof tunnels
- Piégeage densifié avant, pendant, post récolte

En verger :

- Suppression plantes attractives dans l'environnement proche des parcelles
- Gestion des déchets contaminés - Broyage fruits au sol dès récolte terminée



**FORTE IMPLICATION
DES PRODUCTEURS :**
ces bonnes pratiques
ont un coût non
négligeable.

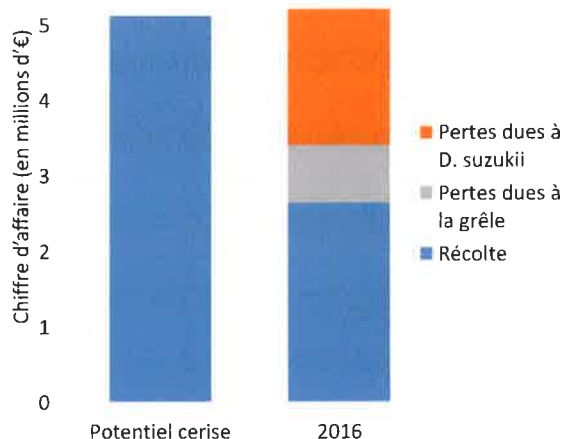
Impact économique du ravageur



- 80 producteurs de cerise adhérents à SICOLY
- Emploi saisonnier : +/- 800 sur 2 mois
- Potentiel de récolte : 1 600 Tonnes
- Pertes 2016: ~800 tonnes
dont ~550 due à *Drosophila suzukii*

**Perte cerise SICOLY
~1,8 Millions € en 2016**

- Pertes petits fruits non négligeables :
fins de récolte abandonnées,
tri sévère, passages rapprochés...



Notre sentiment



La gestion de DS reste très dépendante des conditions climatiques proches récolte.

Association de méthodes de luttres indispensables

Intérêt constant de la coopérative pour la mise en place d'essais de méthodes alternatives

Ex : Mise en place d'essais d'introduction de parasitoïdes en framboises remontantes sous filet insecte proof depuis 2 ans.

Suivi du développement des ovaires chez la femelle DS en sortie d'hiver et printemps



**Ponte de *Trichopria drosophilae*
dans pupes de drosophiles – BIOBEST**

Journées *Drosophila suzukii* 1^{er} et 2 décembre 2016



La lutte biologique contre un ravageur asiatique *Drosophila suzukii*

Axes de recherches et solutions

Pierre Girod et Marc Kenis

CTIFL Centre de Balandran - 1^{er} et 2 Décembre 2016

KNOWLEDGE FOR LIFE



La lutte biologique

- Définition

“Utilisation d’organismes vivants (bénéfiques)
pour lutter contre d’autres organismes vivants (nuisibles)”

- Ennemis naturels

Parasitoïdes



Prédateurs



Pathogènes



KNOWLEDGE FOR LIFE



Trois catégories de lutte biologique

- Lutte biologique **classique** ou par **introduction**

Introduction d'un ennemi naturel d'origine exotique pour lutter contre un ravageur, généralement exotique lui aussi, visant un contrôle permanent du ravageur.

- Lutte biologique par **augmentation**

Augmentation de la densité d'ennemis naturels par lâchers réguliers. Les lâchers peuvent être soit inoculatifs (inoculation en début de saison d'un petit nombre d'individus qui vont se reproduire), soit inondatifs (lâchers massifs pour contrôle unique et immédiat).

- Lutte biologique par **conservation**

Méthodes favorisant l'action des ennemis naturels déjà présents dans le système.

Trois catégories de lutte biologique

- Lutte biologique **classique** ou par **introduction**

Introduction d'un ennemi naturel d'origine exotique pour lutter contre un ravageur, généralement exotique lui aussi, visant un contrôle permanent du ravageur.

- Lutte biologique par **augmentation**

Augmentation de la densité d'ennemis naturels par lâchers réguliers. Les lâchers peuvent être soit inoculatifs (inoculation en début de saison d'un petit nombre d'individus qui vont se reproduire), soit inondatifs (lâchers massifs pour contrôle unique et immédiat).

- Lutte biologique par **conservation**

Méthodes favorisant l'action des ennemis naturels déjà présents dans le système.

Est-ce que ça marche ?

Dryocosmus kuriphilus



Torymus sinensis



Lutte biologique classique contre le Cynips du Châtaignier au Japon

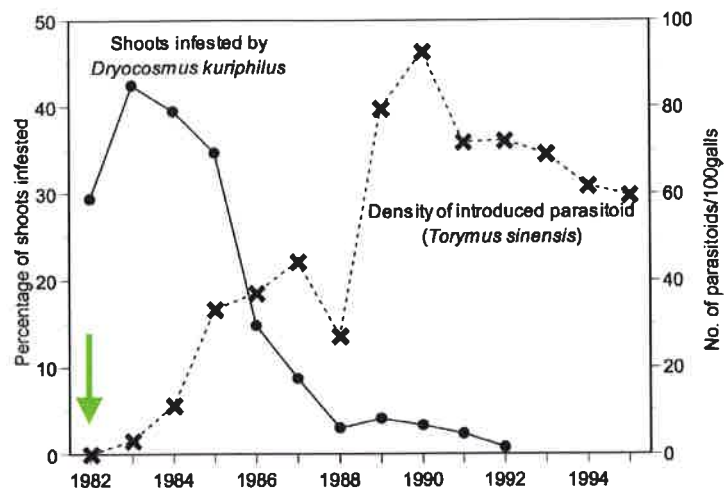


Figure 1. Changes in the percentage of current shoots of chestnut trees infested with *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu and the emergence of *Torymus sinensis* Kamijo from the withered galls after its release at the National Institute of Fruit Tree Science. Source: Moriya et al. (1989a).

KNOWLEDGE FOR LIFE



Est-ce que ça marche ?

- Depuis le premier succès de lutte biologique classique moderne en 1889:
- 6164 cas d'introductions d'ennemis naturels pour lutter contre 692 insectes ravageurs
- 37% se sont établis
- 10% ont contribué à un succès
- **27% des ravageurs ont été contrôlés**

Icerya purchasi & *Rodolia cardinalis*



KNOWLEDGE FOR LIFE



Comment ça marche ? (e.g. Buis)

- Evaluation du problème, établissement de collaborations et analyse de la littérature
- Investigation dans les régions d'origine
- Inventaire des ennemis naturels et étude de leur rôle dans la région d'origine



KNOWLEDGE FOR LIFE



Comment ça marche ? (e.g. Buis)

- Etude de la biologie et de l'écologie des ennemis naturels (e.g. spécificité)
- Choix des espèces candidates à introduire avec liste de priorité
- Demande de permis d'importation (organismes de quarantaine)
- Elevage et test en laboratoire en conditions semi-naturelles



KNOWLEDGE FOR LIFE



Comment ça marche ? (e.g. Buis)

- Demande de permis de lâcher et choix des zones de lâcher
- Vérification de l'établissement et validation
- Distribution de l'agent de lutte biologique dans la zone envahie et évaluation finale



KNOWLEDGE FOR LIFE



Quels sont les bénéfices de la lutte biologique classique ?

Phenacoccus manihoti



- Bénéfice économique en limitant les pertes
- Contrôle **permanent** du ravageur menant à des bénéfices très élevés

Epidinocanis lopezi



- En Afrique: cas de la cochenille du manioc
- Coût : Bénéfice entre **1:200** et **1:500**

KNOWLEDGE FOR LIFE



Quels sont les bénéfices de la lutte biologique classique ?

Orthezia insignis



- Bénéfice écologique
- Au large de l'Afrique: cas du sauvetage des gommiers de Sainte-Hélène

Hyperaspis pantherina



KNOWLEDGE FOR LIFE



Quels sont les bénéfices de la lutte biologique classique ?



- Bénéfice écologique ... et sur la santé



KNOWLEDGE FOR LIFE



Quels sont les risques de la lutte biologique classique ?

Harmonia axyridis



- Risques d'effets négatifs sur les espèces indigènes
- Le cas de la coccinelle asiatique en Europe et en Amérique du Nord

→ Evaluation des risques avant introduction

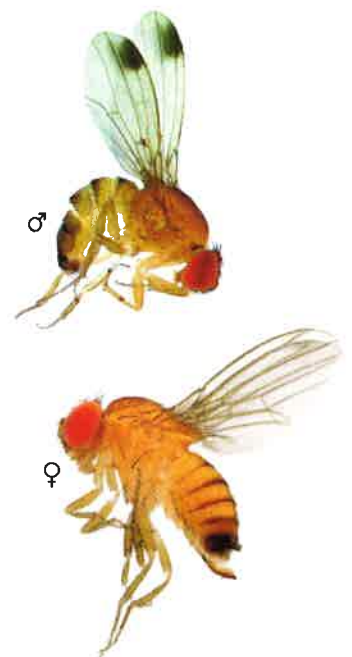


KNOWLEDGE FOR LIFE



Lutte biologique et *Drosophila suzukii*

- +80 espèces hôtes (sauvages et agricoles)
- Cycle de vie très court (12-13 jours)
- +10 générations par an



KNOWLEDGE FOR LIFE



Lutte biologique et *Drosophila suzukii*

- Très peu de parasitisme en Europe

→ Parasitoïdes larvaires

- *Asobara tabida*
- *Leptopilina heterotoma*
- *Leptopilina boulardi*



→ Parasitoïdes pupaux

- *Trichopria drosophilae*
- *Pachycrepoideus vindemiae*



Kacsoh and Schlenke (2012)
Chabert et al. (2012)

Poyet et al. (2013)
Rossi Stacconi et al. (2013)

Gabarra et al. (2015)
Rossi Stacconi et al. (2015)

K. Daane et al. (2016)
Unpublished data (2016)

Photo © Tim Haye & Théotime Colin

KNOWLEDGE FOR LIFE



Lutte biologique et *Drosophila suzukii*

- Très peu de parasitisme en Europe



Parasitoïdes larvaires

- *Asobara tabida*
- *Leptopilina heterotoma*
- *Leptopilina boulardi*



- Ne se développe pas sur *D. suzukii*
- Encapsulation



Parasitoïdes pupaux

- *Trichopria drosophilae*
- *Pachycrepoideus vindemiae*



- Faible taux de réussite
- Peu spécifique

Kacsoh and Schlenke (2012)
Chabert et al. (2012)

Poyet et al. (2013)
Rossi Stacconi et al. (2013)

Gabarra et al. (2015)
Rossi Stacconi et al. (2015)

K. Daane et al. (2016)
Unpublished data (2016)

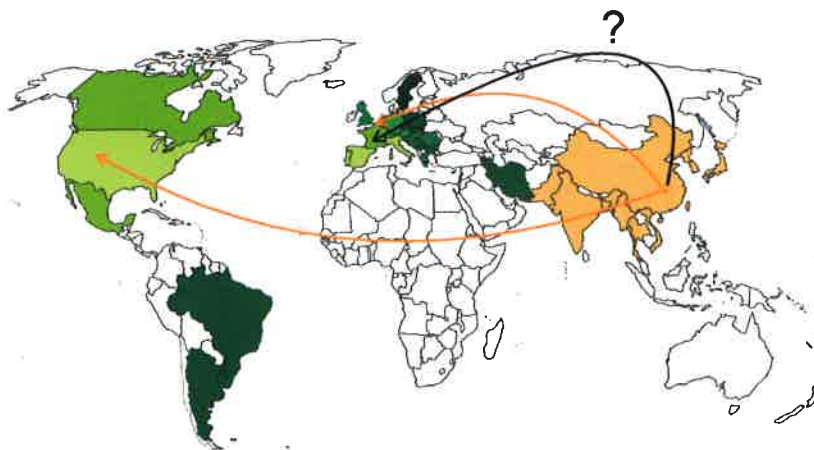
KNOWLEDGE FOR LIFE



Lutte biologique et *Drosophila suzukii*

- Lutte biologique classique

“Introduction **intentionnelle** d'un auxiliaire d'origine **exotique**, adapté au ravageur ciblé dans le but d'un établissement **permanent** de l'auxiliaire et d'un contrôle **pérenne** du ravageur”



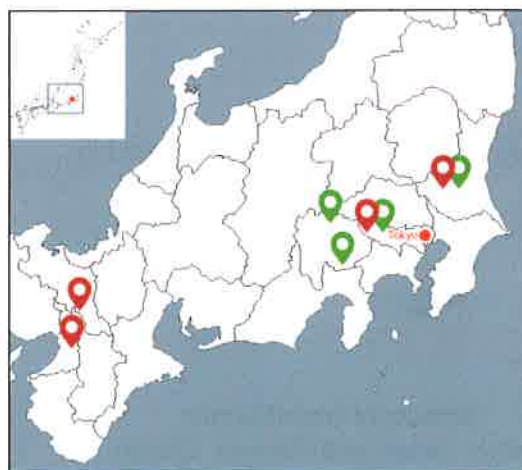
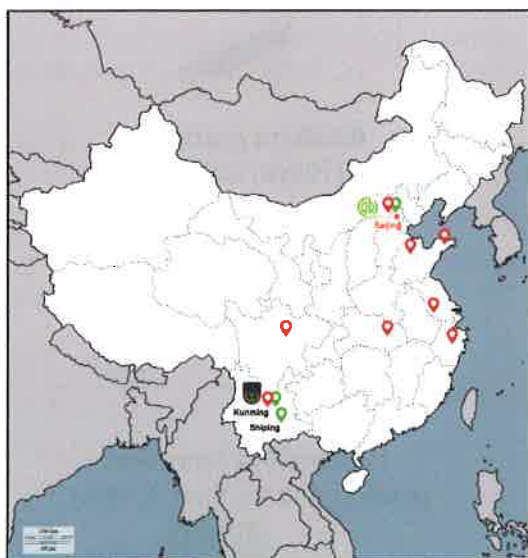
Eilenberg et al. (2001)

KNOWLEDGE FOR LIFE



Etude de *D. suzukii* et des ennemis naturels en Asie

- Campagnes d'échantillonnages en Chine et au Japon (2015 et 2016)



KNOWLEDGE FOR LIFE



Etude de *D. suzukii* et des ennemis naturels en Asie



KNOWLEDGE FOR LIFE



Etude de *D. suzukii* et des ennemis naturels en Asie

- *D. suzukii* est moins fréquente en Asie comparé à l'Europe et les dégâts sont moins élevés (mais variations régionales importantes) avec un parasitisme larvaire entre 0 et + 50%.
- Hymenoptera, Ichneumonoidea, Braconidae



Asobara japonica
(Tokyo, Japan)

- Hymenoptera, Cynipoidea, Figitidae



Ganaspis brasiliensis
(Tokyo, Japan and Yunnan, China)



Leptopilina japonica
(Beijing and Yunnan, China)



Matthew Buffington (2016)

KNOWLEDGE FOR LIFE



Tester l'efficacité de parasitoïdes asiatiques



KNOWLEDGE FOR LIFE



Dr. Marc Kenis



Dr. Tim Haye

• Partenaires

- MoA - CABI (Beijing, China)
- Yunnan Agricultural University (Kunming, China)
- University of Sapporo (Sapporo, Japan)
- INRA (Sophia-Antipolis, France)
- Agroscope (Switzerland)



p.girot@cabi.org

Assalamualikum
merci
शुक्रिया
zikomo
xie-xie
efharistó
ありがとう
kitos
urakoze
gracias
ke itumetse
danke
terima kasih
dhanyawaad

thank you

KNOWLEDGE FOR LIFE

