

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΘΕΜΑ:

«Ανάλυση της ανθεκτικότητας του βαρρόα, *Varroa destructor* (Acari : Varroidae)
σε ακαρεοκτόνα»



Σπυρίδων Λ. Βλογιαννίτης

ΑΘΗΝΑ 2016

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Βόντας Ι.

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΘΕΜΑ:

«Ανάλυση της ανθεκτικότητας του βαρρόα, *Varroa destructor* (Acari : Varroidae)
σε ακαρεοκτόνα»



Σπυρίδων Λ. Βλογιαννίτης

ΑΘΗΝΑ 2016

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Βόντας Ι.

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΘΕΜΑ:

«Ανάλυση της ανθεκτικότητας του βαρρόα, *Varroa destructor* (Acari : Varroidae)
σε ακαρεοκτόνα»

Σπυρίδων Λ. Βλογιαννίτης

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Βόντας Ιωάννης

Τριμελής Επιτροπή:

Βόντας Ιωάννης, καθηγητής

Παπαδούλης Γεώργιος, καθηγητής

Χαριζάνης Πασχάλης, καθηγητής

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελετήθηκε η ανθεκτικότητα του *Varroa destructor* στα ακαρεοκτόνα *coumaphos*, *τ-fluvalinate*, *amitraz*. Αρχικά διερευνήθηκαν τα επίπεδα ανθεκτικότητας σε φυσικούς πληθυσμούς *Varroa* από την Άνδρο, τη Νάξο και την Αττική με κλασικές μεθόδους βιοδοκιμών και συγκρίθηκαν με τον ευαίσθητο πληθυσμό αναφοράς *AUA*. Ανθεκτικοί στη δραστική ουσία *coumaphos* εμφανίστηκαν τρεις πληθυσμοί, ο πληθυσμός *Andros* με συντελεστή ανθεκτικότητας (RR) 662,07, ο πληθυσμός *Naxos#A* με συντελεστή ανθεκτικότητας (RR) 30 και ο πληθυσμός *Naxos#B* με συντελεστή ανθεκτικότητας (RR) 76. Ο πληθυσμός *Andros* που παρουσίασε τα εντυπωσιακά ποσοστά ανθεκτικότητας εξετάστηκε με κλασικές μεθόδους βιοδοκιμών και χρήση παρεμποδιστών των ενζύμων αποτοξικοποίησης ενώ ελέγχθηκε η ενεργότητα της ακετυλοχολινεστεράσης και τα ενζυμικά συστήματα που προκαλούν αποτοξικοποίηση των εντομοκτόνων (εστεράσες, τρανσφεράσες της γλουταθειόνης και P450s οξειδάσες) προσδιορίζοντας α) την ενεργότητα των ενζύμων αποτοξικοποίησης, β) την επίδραση ενζυμικών παρεμποδιστών στο φαινόμενο της ανθεκτικότητας. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι ο βιοχημικός μηχανισμός είναι υπεύθυνος για την ανθεκτικότητα και ότι οι πληθυσμοί δεν είχαν αναπτύξει διασταυρωτή ανθεκτικότητα. Άρα σύμφωνα με όλες τις ενδείξεις η ανθεκτικότητα των συγκεκριμένων πληθυσμών οφείλεται στη δράση ενζύμων αποτοξικοποίησης.

ΑΘΗΝΑ 2016

Λέξεις κλειδιά: Βαρρόα, ανθεκτικότητα, ακαρεοκτόνα, ένζυμα
αποτοξικοποίησης

Abstract

We conducted laboratory tests investigating the resistance of *Varroa* mites infesting honey bees in AUA (Agricultural University of Athens), Andros and Naxos after exposure to *coumaphos*, *τ-fluvalinate*, *amitraz* . Results indicated that Andros and Naxos are resistant to coumaphos and it's associated with the history of treatments *Andros* mites showed Resistance Ratio (RR) 662,07, *Naxos#A* mites showed Resistance Ratio (RR) 30 and *Naxos#B* mites showed Resistance Ratio (RR) 76. It's clearly that coumaphos is ineffective against these mites especially Andros. This represents the first known reported case of coumaphos resistance in *Varroa destructor* in Greece. We've investigated the possibility of cross-resistance between coumaphos and other acaricides. *Andros* mites exposed to combination of coumaphos and detoxification enzymes inhibitors. Also, the acetylcholinesterase activity and the activity of detoxification enzymes (esterases, P450s, GSTs) were measured. Laboratory findings indicate that probably some detoxification enzymes are responsible for the resistance of Andros mites.

ATHENS 2016

Keywords: *Varroa* mites, resistance, acaricides, detoxification enzymes

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
Η ΒΑΡΡΟΪΚΗ ΑΚΑΡΙΑΣΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ ΚΑΙ ΤΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΠΟΥ ΔΗΜΙΟΥΡΓΗΣΕ	10
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ	12
ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ	14
ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ – ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΣΤΑΔΙΩΝ	18
ΔΙΑΔΟΣΗ-ΠΡΟΣΒΟΛΗ	19
ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	20
ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ.....	21
ΔΙΑΓΝΩΣΗ	23
Η ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΒΑΡΡΟΑ	24
Βιολογικές μέθοδοι-βιολογικά σκευάσματα	26
Φυσικές μέθοδοι.....	28
Μηχανικές μέθοδοι.....	28
Χημική καταπολέμηση	29
Η ανθεκτικότητα εντόμων και ακάρεων στα εντομοκτόνα	32
Μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα και ακαρεοκτόνα	34
Αντικείμενο της εργασίας	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	38
Α. Διερεύνηση των επιπέδων ανθεκτικότητας σε ακαρεοκτόνα πληθυσμών του <i>V.destructor</i> στην Ελλάδα με κλασικές μεθόδους βιοδοκιμών	38
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	38
Πληθυσμοί <i>V.destructor</i>	38
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	42

Υπολογισμός των επιπέδων ανθεκτικότητας.....	42
Ανθεκτικότητα στο Coumaphos	42
Ανθεκτικότητα στο τ-Fluvalinate & Amitraz	44
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	47
Βιοδοκιμές με συνεργιστές	48
Επίδραση των συνεργιστών στην ανθεκτικότητα	49
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	51
Β. Προσδιορισμός ενεργότητας ενζύμων αποτοξικοποίησης - εν δυνάμει βιοχημικής ανθεκτικότητας στο coumaphos	52
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	52
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	52
Ενζυμικά υποστρώματα και υλικά	52
Πληθυσμοί V.destructor.....	52
Προετοιμασία δειγμάτων.....	53
Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεΐνης	53
Μέτρηση ενεργότητας ενζυμικών συστημάτων	54
Ακετυλοχολινεστεράση	54
Μεταφοράσες ή τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs).....	54
Εστεράσες.....	55
P450s οξειδάσες	55
Αποτελέσματα	56
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	57
Ενεργότητα ακετυλοχολινεστεράσης.....	57
Ενεργότητα μεταφορασών της γλουταθειόνης	58
Ενεργότητα εστερασών.....	59
Ενεργότητα των P450 οξειδασών	61
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	61
ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	62

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΑ ΣΧΕΔΙΑ	65
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	66

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον επιβλέποντα καθηγητή και διευθυντή του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας κ. Ιωάννη Βόντα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου το συγκεκριμένο θέμα. Με την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ υπό την επίβλεψη του καθοδηγώντας με, με υπομονή, και διαθέτοντας τον χρόνο του όποτε αυτό ήταν απαραίτητο, με βοήθησε να αποκτήσω πολύτιμη εμπειρία.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Πασχάλη Χαριζάνη, καθηγητή του εργαστηρίου Σηροτροφίας και Μελισσοκομίας για τη βοήθεια και τη διάθεση του εργαστηριακού χώρου καθώς και δειγμάτων *Varroa destructor* χωρίς τα οποία δε θα μπορούσε να έχει πραγματοποιηθεί αυτή η εργασία.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον πρότανη του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και μέλος της επιτροπής κ. Παπαδούλη Γεώργιο για την συμμετοχή του στην παρούσα εργασία.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια του εργαστηρίου Φαρμακολογίας Μώρου Ευαγγελία και τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Πιπίνη Δήμητρα για την βοήθεια, συμπαράσταση, γνώσεις και χρόνο που τόσο απλόχερα μου παρείχαν, καθώς και την τεράστια υπομονή που υπέδειξαν στις ερωτήσεις, απορίες και δυσκολίες που μου δημιουργήθηκαν κατά την πορεία των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου που με την παρουσία τους δημιουργούσαν ένα ευχάριστο και δημιουργικό περιβάλλον εργασίας.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Βαρροϊκή Ακαρίαση είναι σοβαρός εχθρός των μελισσών και οφείλεται στο άκαρι *Varroa destructor* Anderson & Trueman (Ακαρι:Varroidae), το οποίο παρασιτεί στις ενήλικες μέλισσες και το γόνο. Μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του '70 ήταν σχεδόν άγνωστο, σήμερα όμως, αποτελεί το σοβαρότερο πρόβλημα της μελισσοκομίας όλου του κόσμου (εικ.1).

Η ΒΑΡΡΟΪΚΗ ΑΚΑΡΙΑΣΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ ΚΑΙ ΤΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΠΟΥ ΔΗΜΙΟΥΡΓΗΣΕ

Το σοβαρό αυτό παράσιτο της μέλισσας ήρθε στη χώρα μας από τις γειτονικές χώρες Βουλγαρία, Γιουγκοσλαβία και πιθανόν την Τουρκία. Η πρώτη εγκατάσταση της φαίνεται ότι έγινε στην Ορεστιάδα το 1977 ή και νωρίτερα. Την άνοιξη του 1978 επισημαίνεται για πρώτη φορά σε δείγματα νεκρών μελισσών που εστάλησαν από μελισσοκομεία της Κοινότητας Δικαίων-Ορεστιάδας του Ν. Έβρου. Το νέο αυτό παράσιτο, αφού πέρασε τα όρια της Θράκης, επεκτάθηκε γρήγορα στη Μακεδονία και ταχύτατα στην υπόλοιπη Ηπειρωτική και νησιωτική Ελλάδα. Σήμερα μόνο μερικά νησιά θεωρούνται αμόλυντα (Αεράκη 2006).

Η ταχεία εξάπλωση και διασπορά του παρασίτου οφείλεται σε δύο λόγους: α) στη νομαδική μελισσοκομία και β) στο ότι η εισβολή του παρασίτου πιθανότατα έγινε όχι μόνο στην περιοχή της Ορεστιάδας όπου πρωτοεπισημάνθηκε, αλλά και σε άλλα σημεία της Βουλγαρικής, Γιουγκοσλαβικής και Τουρκικής μεθοριακής γραμμής.

Τα προβλήματα που δημιούργησε στην Ελλάδα πήραν τη μεγαλύτερη έκταση τους το 1981, οπότε είχαμε και τις μεγαλύτερες απώλειες σε μελισσοσμήνη και παραγωγή μελιού. Η ζημιά δηλαδή που προκάλεσε η βαρροϊκή ακαρίαση ήταν η καταστροφή τουλάχιστον 220.000 μελισσοσμηνών σε όλη τη χώρα.

Το παράσιτο άρχισε να αντιμετωπίζεται και να ελέγχεται καλά από το 1981. Έτσι διαπιστώνουμε σύμφωνα με στοιχεία από δηλώσεις που έγιναν για επιδότηση των μελισσοσμηνών ότι ο αριθμός τους ξεπέρασε πάλι το 1.000.000 και έφθασε ξανά το 1.100.000 περίπου το 1982.

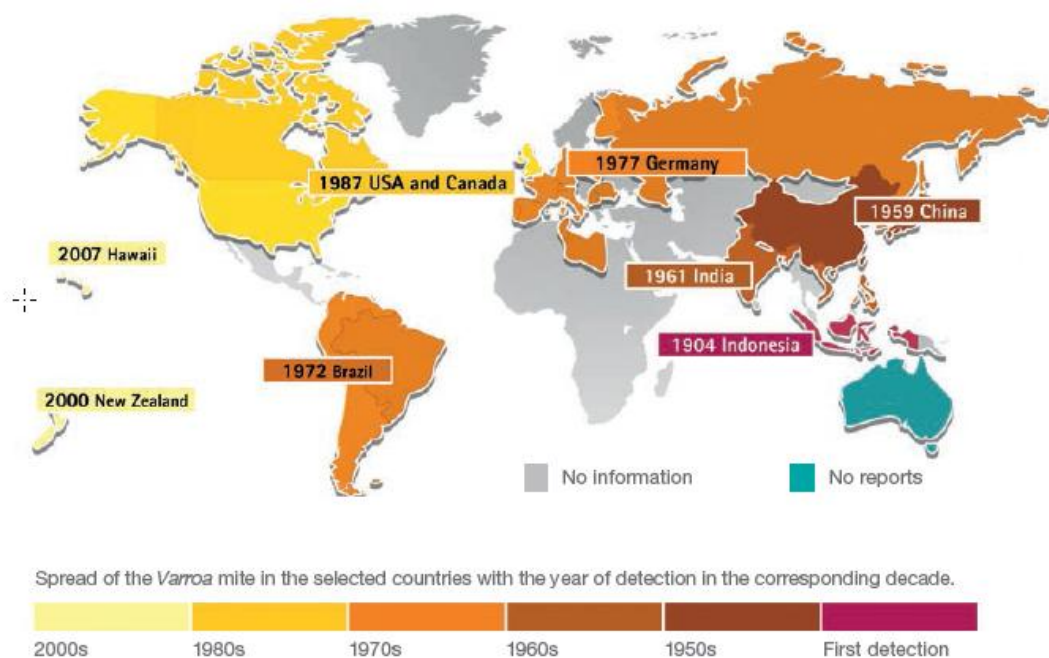
Για τη γρήγορη αυτή ανάκαμψη της μελισσοκομίας βασικό ρόλο έπαιξε η ενημέρωση των μελισσοκόμων για το άκαρι, που έγινε από τους επιστήμονες της χώρας των αρμόδιων εργαστηρίων και οι συνεχείς προσπάθειες για εξεύρεση του κατάλληλου σκευάσματος για την αντιμετώπισή της.

Το εργαστήριο Γεωργικής Ζωολογίας και Σηροτροφίας του Γ.Π.Α ξεκίνησε αμέσως τις προσπάθειες από το 1978, στην αρχή με ενημέρωση των μελισσοκόμων με την έκδοση ειδικού άρθρου που δημοσιεύτηκε στο περιοδικό ΜΕΛΙΣΣΑ για τον εχθρό και την αντιμετώπιση του και στη συνέχεια με ένταση των ερευνητικών του προσπαθειών για εξεύρεση κατάλληλου σκευάσματος.

Αποτέλεσμα αυτών των προσπαθειών ήταν το Μαλαθείο $1 \frac{0}{00}$ δραστικής ουσίας που χρησιμοποιήθηκε ευρύτατα από όλους τους μελισσοκόμους από το 1981 και συνέβαλε ουσιαστικά στον έλεγχο του παρασίτου και στην ταχεία ανάκαμψη της μελισσοκομίας στα επόμενα χρόνια.

Οι προσπάθειες συνεχίζονται από πολλούς επιστήμονες και αρμόδια εργαστήρια. Έχουν δοκιμαστεί περισσότερες από 100 ουσίες με βαρροακτόνες ιδιότητες και σήμερα το παράσιτο ελέγχεται αρκετά καλά αν παράλληλα με τη σωστή χημειοθεραπεία, γίνονται και κατάλληλοι μελισσοκομικοί χειρισμοί (Πελεκάσης, κ.ά., 1978, Σαντάς, 1990, Υφαντίδης, 1987).

Mite migration



Εικόνα 1. Διασπορά του *Varroa* σε διάφορα μέρη της γης (Πηγή: *Bayer bee care center*)

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Το αίτιο της Βαρροϊκής ακαρίασης είναι το άκαρι *Varroa destructor* της οικογένειας *Varroidae*. Το *Varroa* παρουσιάζει διμορφισμό των φύλων και συγκεκριμένα τοθηλυκό (εικ. 2) έχει χρώμα καστανέρυθρο, σώμα νωτοκοιλιακά πεπλατυσμένο, ελλειπτικό με διαστάσεις 1-1,75 mm μήκος και 1,55-2 mm πλάτος, είναι δε ορατό με γυμνό μάτι και μοιάζει με μικρό καστανό λέπι. Η ραχιαία επιφάνεια καλύπτεται από ένα σκληρό χιτίνινο θυρεό. Η κοιλιακή επιφάνεια αποτελείται από πλάκες χιτίνης που ενώνονται μεταξύ τους με λεπτότερες μεμβράνες. Ολόκληρο το σώμα καλύπτεται από μακριές και σκληρές τρίχες. Έχει τέσσερα ζεύγη δυνατά, κοντά και κυρτά πόδια που αποτελούνται από επτά τμήματα. Το τελευταίο απ' αυτά είναι οπλισμένο με ένα είδος βεντούζας, η οποία βοηθά στο να συγκρατείται καλά πάνω στον ξενιστή. Το πρώτο ζεύγος εξέχει από την περιφέρεια του σώματος, φέρει αισθητήρια όργανα και παίζει ρόλο κεραιών. Τα στοματικά μόρια βρίσκονται συνήθως κρυμμένα

κάτω από το σώμα και αποτελούνται από δυο ποδοπροσακτρίδες και δύο λεπτές χηληκεραίες και είναι προορισμένα να τρυπούν και να μυζούν.



Εικόνα 2. Ακμαίο θηλυκό *Varroa destructor*. (Πηγή: Brochure: The Varroa mite)

Το αρσενικό είναι μικρότερο από το θηλυκό (εικ. 4), έχει διαστάσεις 0,80-0,95 x 0,70-0,93 mm και σχήμα περίπου κυκλικό. Είναι ελαφρά χιτινισμένο και έχει χρώμα υπόλευκο. Τα πόδια του είναι λεπτά και μακριά και εξέχουν χαρακτηριστικά από την περιφέρεια του σώματος. Τα χηληκέρατα που φέρει είναι διαμορφωμένα όχι για νύξη, αλλά για μεταφορά του σπερματοφόρου. Τα ατελή στάδια είναι το αυγό, η πρωτονύμφη και η δευτερονύμφη (εικ 3).



Εικόνα 3. Πρωτονύμφη, δευτερονύμφη, ενήλικο αρσενικό (Πηγή: Giles San Martin)



Εικόνα 4. Αρσενικό *Varroa* αριστερά, θηλυκό *Varroa* δεξιά (Πηγή: Brochure: The Varroa mite)

ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Το βαρρόα παρασιτεί το γόνο (εικ.5) και τις ενήλικες μέλισσες (εικ.6), δύο στάδια εξέλιξης του ίδιου εντόμου με πολύ διαφορετικές συνθήκες ζωής. Έχει προσαρμοσθεί στη ζωή του ξενιστή του, ώστε να αξιοποιεί το κάθε στάδιο για την επιτέλεση των βασικών του αναγκών, της διατροφής, του πολλαπλασιασμού και της διασποράς (εικ.7). Ο γόνος προσφέρει την απαραίτητη τροφή, που χρησιμοποιεί σχεδόν αυτούσια το βαρρόα (Teworson & Engels, 1982) και ασφαλές καταφύγιο για την ωοτοκία και την ανάπτυξη των ευαίσθητων ανώριμων σταδίων του. Οι ενήλικες μέλισσες του εξασφαλίζουν τη διασπορά μέσα και έξω από την κυψέλη, καθώς και την επιβίωση κατά το διάστημα που δεν εκτρέφεται γόνος.

Η προσβολή αρχίζει με την είσοδο του γονιμοποιημένου βαρρόα σε ένα κελί που περιέχει προνύμφη. Τα βαρρόα δείχνουν μεγαλύτερη προτίμηση στον κηφηνογόνο, παρά στον εργατικό γόνο. Η προτίμηση αυτή οφείλεται κυρίως στο ότι ο κηφηνογόνος παράγει περισσότερες ουσίες που έλκουν το βαρρόα, αλλά και σε άλλους λόγους, όπως οι συχνότερες επισκέψεις μελισσών για την

περιποίηση του κηφνογόνου και το μεγαλύτερο διάστημα που απαιτείται για το σφράγισμα του κηφνοκελίου. Συνήθως δεν προσβάλλουν τα βασιλικά κελιά. Έχουν όμως αναφερθεί περιπτώσεις προσβολής σε έντονα μολυσμένα μελίσσια (Χαριζάνης, 1992).

Μετά την είσοδό του στο κελί, το βαρρόα διεισδύει ανάμεσα στο τοίχωμα του κελιού και στο σώμα της προνύμφης, φθάνει στον πυθμένα του κελιού όπου κολλάει με τη ράχη στην τροφή της προνύμφης και παγιδεύεται (Υφαντίδης, 1987). Λίγες ώρες μετά το σφράγισμα του κελιού, η προνύμφη καταναλώνει την τροφή, το βαρρόα ελευθερώνεται και γευματίζει. Εξήντα περίπου ώρες μετά το σφράγισμα του κελιού το βαρρόα εναποθέτει το πρώτο αυγό και στη συνέχεια, ανά τριάντα περίπου ώρες, τα υπόλοιπα. Στον εργατικό γόνο είναι δυνατό να γεννήσει μέχρι πέντε αυγά και στον κηφνογόνο μέχρι επτά. Η εξάποδη προνύμφη αναπτύσσεται μέσα στο αυγό, μεταμορφώνεται σε οκτάποδη πρωτονύμφη και στη συνέχεια βγαίνει από αυτό. Η πρωτονύμφη μεταμορφώνεται σε δευτερονύμφη και αυτή σε ενήλικο. Ολόκληρος ο βιολογικός κύκλος διαρκεί 6 ημέρες περίπου για τα θηλυκά άτομα και 7 για τα αρσενικά. Το δεύτερο αυγό που γεννιέται είναι αγονιμοποίητο και απ' αυτό προκύπτει το μοναδικό αρσενικό άτομο. Τα υπόλοιπα είναι γονιμοποιημένα και από αυτά γεννιούνται θηλυκά.

Από τα άτομα που θα γεννηθούν στον εργατικό γόνο, μόνο τα δύο πρώτα, και σε ένα μικρό ποσοστό και το τρίτο, προλαβαίνουν να ενηλικιωθούν στο διάστημα των 12 ημερών που το κελί παραμένει κλειστό. Αντίθετα, στον κηφνογόνο, που παραμένει σφραγισμένος 14 ημέρες, προλαβαίνουν να ενηλικιωθούν τέσσερα ή και πέντε. Τα άτομα που δεν προλαβαίνουν να ενηλικιωθούν, πεθαίνουν από αστία, επειδή τα στοματικά τους μόρια αδυνατούν να τρυπήσουν το σκληρό σκελετό της μέλισσας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, ο αριθμός των θηλυκών απογόνων στον εργατικό γόνο να κυμαίνεται περίπου στο 1-1,2 και στον κηφνογόνο στο 2,7 (Υφαντίδης, 1987). Το αρσενικό, αφού γονιμοποιήσει τα θηλυκά μέσα στο κελί, πεθαίνει επειδή τα στοματικά του μόρια έχουν μεταπλασθεί σε όργανα μεταφοράς του σπέρματος και δεν μπορεί να τραφεί.

Τα ενήλικα βαρρόα, μετά την έξοδο τους από το κελί, εγκαταλείπουν τη νεαρή μέλισσα και προσκολλούνται σε κάποια άλλη. Δείχνουν ιδιαίτερη προτίμηση στις μέλισσες που ασχολούνται με το τάισμα του γόνου και τους

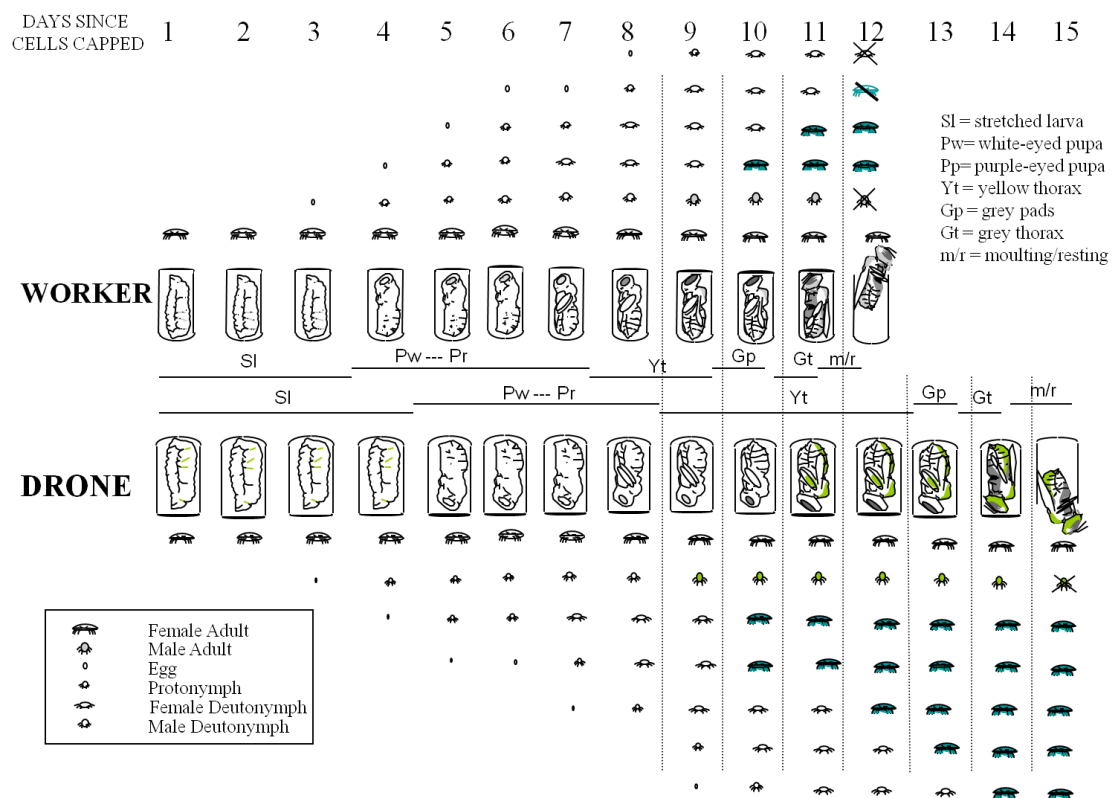
κηφήνες. Μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό, μικρότερο του 1%, παρασιτεί τις συλλέκτριες. Εγκαθίστανται βαθιά μέσα στα δαχτυλίδια της κοιλιάς των μελισσών, επειδή μόνο τις λεπτές μεμβράνες που τα ενώνουν είναι ικανές να διατρυπήσουν με τα στοματικά τους μόρια. Η θέση αυτή εκτός από τη διατροφή τους εξασφαλίζει και ασφαλή μεταφορά. Παραμένουν επάνω στις ενήλικες μέλισσες 5-15 ημέρες και στη συνέχεια εισέρχονται σε κάποιο κελί για να ωοτοκήσουν. Από αυτά το 17-28% στον εργατικό γόνο και το 5% στον κηφηνογόνο αποτυγχάνει να αναπαραχθεί. Αποφεύγουν τα κατειλημμένα από άλλα βαρρόα κελιά και μόνο στην ανάγκη εισέρχονται σε αυτά. Στην περίπτωση που περισσότερα από ένα βαρρόα ωοτοκήσουν στο ίδιο κελί, ο αριθμός του κάθε ενός είναι μικρότερος του φυσιολογικού. Στα μελίσσια που εκτρέφουν γόνο, μόνο ένα μικρό ποσοστό των βαρρόα βρίσκεται επάνω στις μέλισσες. Τα υπόλοιπα παρασιτούν στο γόνο όπου και αναπαράγονται. Αρκεί η παρουσία 500 κελιών με γόνο, για να φιλοξενήσει το 50% των βαρρόα ενός μολυσμένου μελισσιού. Τα βαρρόα που αναπαράγονται, ζουν περίπου δύο μήνες. Την περίοδο που το μελίσσι δεν εκτρέφει γόνο, τα βαρρόα παρασιτούν στις ενήλικες μέλισσες και επιβιώνουν για μακρύ χρονικό διάστημα, το οποίο το χειμώνα είναι δυνατό να ξεπεράσει τους οκτώ μήνες.



Εικόνα 5. Παρασιτισμός *Varroa* σε νύμφη μέλισσας (Πηγή: Honey Bee Suite)



Εικόνα 6. Παρασιτισμός *Varroa* σε ενήλικη μέλισσα (Πηγή: Honey Bee Suite)



ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ – ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΣΤΑΔΙΩΝ

Ο κύκλος αναπαραγωγής του *V. destructor* συμβαδίζει κατ' ανάγκη με τον κύκλο αναπαραγωγής της μέλισσας. Δηλαδή η αναπαραγωγή αρχίζει με το ξεκίνημα του γόνου νωρίς την άνοιξη και σταματά αργά το φθινόπωρο, όταν δηλαδή δεν υπάρχει πλέον γόνος.

Το άκαρι αυτό είναι ωοζοτόκο, δηλαδή η εμβρυακή ανάπτυξη αρχίζει και συντελείται όταν ακόμη τα αυγά βρίσκονται μέσα στο μητρικό σώμα και έτσι, στα αυγά που γεννιούνται, διαφαίνονται οι καταβολές των εξαρτημάτων του με τρία ζεύγη ποδών σχηματιζόμενης λάρβας. Η επώαση διαρκεί περίπου δύο ημέρες και από τα αυγά εξέρχονται οι πρωτονύμφες με τέσσερα ζεύγη ποδών. Το άκαρι υφίσταται δύο συνολικά εκδύσεις και, αφού διέλθει από το στάδιο της δευτερονύμφης, εξελίσσεται σε ακμαίο.

Έτσι όπως διαφαίνεται και από τον πίνακα 1, η διάρκεια των προνυμφικών σταδίων μαζί με την διήμερη επώαση κυμαίνεται από 6-7 ημέρες για τα αρσενικά και 7-8 ημέρες για τα θηλυκά.

Μετά την γονιμοποίηση, τα αρσενικά, που δεν διατρέφονται, πεθαίνουν. Τα δε θηλυκά αρχίζουν, εφόσον υπάρχει γόνος, να ωοτοκούν και ζουν, ανάλογα με την εποχή, από μερικούς μήνες μέχρι και χρόνια. Έτσι, όσα γεννηθούν άνοιξη-καλοκαίρι ζουν 2-3 μήνες. Όσα γεννηθούν φθινόπωρο-αρχές χειμώνα ζουν 5-8 μήνες, αναφέρονται όμως και περιπτώσεις που ζουν μέχρι δύο χρόνια (Υφαντίδης, 1987).

ΣΤΑΔΙΟ	ΘΗΛΥΚΟ	ΑΡΣΕΝΙΚΟ
ΑΒΓΟ	Ωοειδές, υπόλευκον χρώματος με διαστάσεις 0,55x0,40 mm. Εκκόλαψη δύο ημέρες μετά την ωοτοκία.	
ΠΡΩΤΟΝΥΜΦΗ	Στο στάδιο αυτό δεν υπάρχει ακόμα φανερή διάκριση των δύο φύλων. Σώμα ωοειδές, ασθενικά χιτρινισμένο, χρώματος λευκού στιλπνού, με διαστάσεις 0,6x0,5 mm	
	Διάρκεια σταδίου 4-5 ημέρες	Διάρκεια σταδίου 2-3 ημέρες
ΔΕΥΤΕΡΟΝΥΜΦΗ	Στο στάδιο αυτό διακρίνονται δύο εμφανείς μορφές, η αρσενική και η θηλυκή δευτερονύμφη.	
	Σώμα ωοειδές, χρώματος λευκού-στιλπνού, και διαστάσεων 1x1,2 mm. Διάρκεια σταδίου 1-2 ημέρες.	Σώμα σχεδόν στρογγυλό, χρώματος λευκού-στιλπνού και διαστάσεων 0,7x0,7 mm. Διάρκεια σταδίου 1-2 ημέρες.
ΑΚΜΑΙΟ	Σώμα πεπλατυσμένο νωτοκοιλιακώς, ελλειπτικό, καστανέρυθρο και διαστάσεων 1,8x1,2 mm.	Σώμα υποσφαιρικό, γκριζόασπρο ή κιτρινωπό και διαστάσεων 0,8x0,8 mm.

Πίνακας 1. Μορφολογία σταδίων θηλυκού και αρσενικού βαρρόα.

ΔΙΑΔΟΣΗ-ΠΡΟΣΒΟΛΗ

Πηγή μόλυνσης σε μία περιοχή αποτελούν τα προσβεβλημένα μελίσσια. Το άκαρι μεταδίδεται από κυψέλη σε κυψέλη με τις παραπλανημένες εργάτριες, τους κηφήνες, τη λεηλασία και τους μελισσοκομικούς χειρισμούς. Μικρό ρόλο πιθανό να παίζουν σαν μεταφορείς οι σφήκες καθώς και διάφορα είδη μοναχικών μελισσών. Τα πρώτα περιστατικά μόλυνσης εμφανίζονται στα δυνατά μελίσσια που λεηλατούν τα αδύνατα και σ' αυτά που ετοιμάζονται να σμηνουργήσουν. Μετά την εγκατάσταση μιας νέας εστίας, η μετάδοση στη γύρω περιοχή γίνεται με γρήγορο ρυθμό, που επηρεάζεται από την ένταση της προσβολής και την πυκνότητα των μελισσιών στην περιοχή. Σημαντικά προβλήματα δημιουργούνται στα πευκοδάση, όπου μεταφέρονται πολλές χιλιάδες μελίσσια κατά τη μελιτοφορία του πεύκου.

Σε περιοχές που το παράσιτο ενδημεί, η παραπλάνηση σε συνδυασμό με την πυκνότητα των μελισσιών, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην επαναμόλυνση ή την επιμόλυνση μελισσιών που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία. Σημαντικό ρόλο

παίζει και η ιδιότητα που έχουν οι μέλισσες των έντονα προσβεβλημένων μελισσιών να γεμίζουν τον πρόλοβο τους με μέλι, να εγκαταλείπουν την κυψέλη τους μεμονωμένα ή ομαδικά και να ζητούν καταφύγιο σε παρακείμενα μελίσσια.

Ο πληθυσμός των ακάρεων ενός μελισσιού αυξάνει προοδευτικά από την άνοιξη προς το φθινόπωρο. Ο ρυθμός αύξησης επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Η πρώιμη έναρξη εκτροφής του γόνου και η συνέχισή της μέχρι αργά τον χειμώνα, η πρώιμη και μακροχρόνια εκτροφή κηφηνογόνου, οι παραγωγικές βασίλισσες και οι συνθήκες που ευνοούν την εκτροφή μεγάλης έκτασης γόνου, ευνοούν την γρήγορη ανάπτυξη του πληθυσμού του βαρρόα. Η αύξηση αυτή είναι ιδιαίτερα γρήγορη στην περίοδο Αυγούστου-Οκτωβρίου. Επειδή από τον Ιούλιο και μετά, η ωοτοκία της βασίλισσας επιβραδύνεται, η έκταση του γόνου και ο πληθυσμός του μελισσιού περιορίζονται. Η πληθυσμιακή σχέση παρασίτου-ξενιστή διαταράσσεται υπέρ του πρώτου αυτή την περίοδο. Ανάλογα με την ένταση της μόλυνσης, είναι δυνατόν να εμφανισθούν τα συμπτώματα του παρασιτισμού, λιγότερο ή περισσότερο έντονα. Κατά τη διάρκεια του χειμώνα ο πληθυσμός του βαρρόα μειώνεται. Ένα μεγάλο μέρος όμως επιβιώνει μέχρι να αρχίσει η εκτροφή του γόνου και να αναπαραχθεί. Ο αριθμός των βαρρόα ενός μελισσιού μέσα σε ένα χρόνο, από άνοιξη σε άνοιξη, σχεδόν δεκαπενταπλασιάζεται.

ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Η προσβολή του βαρρόα στο μελίσσι εκδηλώνεται σε δύο μέτωπα, στο γόνο και στις ενήλικες μέλισσες, και με πολλούς τρόπους. Οι σημαντικότεροι από αυτούς είναι η μύζηση αιμολέμφου, η έγχυση τοξινών, που το άκαρι εκλύει στη διάρκεια του γεύματος του, ο μηχανικός ερεθισμός, το άνοιγμα θυρών εισόδου για άλλους μικροοργανισμούς και η μεταφορά παθογόνων μικροοργανισμών.

Η σημαντικότερη ζημιά που προκαλεί το άκαρι είναι η μύζηση αιμολέμφου στα διάφορα στάδια του γόνου, που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του σωματικού βάρους, του όγκου της αιμολέμφου, του αριθμού αιμοκυττάρων και της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών. Προκαλεί επίσης αλλοιώσεις στη σύνθεση των αιμοκυττάρων, γήρανση και επιτάχυνση του ρυθμού αντικατάστασης των

αιμοκυττάρων. Πιθανόν οι μεταβολές αυτές να μην οφείλονται μόνο στην αφαίρεση αιμολέμφου, αλλά και σε βιοχημικές μεταβολές που ακολουθούν πιθανή έγχυση τοξινών στο σώμα του ξενιστή. Οι μεταβολές αυτές αφορούν τόσο τα ατελή στάδια του γόνου, όσο και τα ενήλικα άτομα που θα προκύψουν(Αεράκη 2006).

Η διάνοιξη θυρών εισόδου με τα στοματικά μόρια και η μεταφορά παθογόνων μικροοργανισμών, αυξάνει τη νοσηρότητα και υποβοηθά τις δευτερογενείς μολύνσεις του μελισσιού με διάφορα βακτήρια. Είναι, όμως, μικρότερης σημασίας σε σχέση με τη μύζηση της αιμολέμφου (Αεράκη 2006).



Εικόνα 8. Μέλισσα ύστερα από παρασιτισμό *Varroa*

ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

Μέλισσες που φέρουν επάνω τους ένα ή περισσότερα ακάρεα, κάνουν συνεχείς προσπάθειες για να απαλλαχθούν από αυτά, γίνονται νευρικές, πετούν με δυσκολία ή δεν μπορούν να πετάξουν καθόλου όταν τα ακάρεα είναι προσκολλημένα κάτω από τις πτέρυγες. Τότε βγαίνουν έξω από την κυψέλη, περπατούν πάνω στο έδαφος, κάνοντας αποτυχημένες προσπάθειες να πετάξουν, απομακρύνονται και χάνονται μακριά από την κυψέλη.

Η διάρκεια ζωής των μελισσών που παρασιτούνται μειώνεται κατά 1,5 έως 2 φορές ανάλογα με την ηλικία στην οποία βρίσκονται όταν μολύνονται. Έτσι έχει βρεθεί ότι αν προσβληθούν σε ηλικία 1-10 ημερών, η ζωή τους γίνεται 2 φορές μικρότερη, ενώ αν προσβληθούν σε ηλικία 15-20 ημερών γίνεται κατά 1,4 έως 1,8 μικρότερη.

Η δυναμικότητα του μελισσιού προοδευτικά μειώνεται, ο γόνος εμφανίζεται συνεχώς και περισσότερο διάσπαρτος και θυμίζει εικόνα σηψιγονίας. Τα σφραγίσματα μικρότερου ή μεγαλύτερου αριθμού κελιών είναι βυθισμένα, έχουν χρώμα σκοτεινότερο και μερικά από αυτά έχουν τρύπες ή σχισμές. Στα κελιά αυτά υπάρχουν συνήθως νεκρές νύμφες αλλά και προνύμφες, καθώς και νεκρά και ζωντανά βαρρόα. Οι προνύμφες συχνά βρίσκονται σε διάφορα στάδια αποσύνθεσης. Η σύσταση τους όμως δεν είναι κολλώδης και αποβάλλονται εύκολα από τα κελιά. Ο κηφηνόγονος εμφανίζει σημαντικότερη προσβολή από αυτήν των εργατριών. Συχνά παρατηρούνται επιπλοκές από άλλες ασθένειες του γόνου, οι οποίες ανάλογα με τη βαρύτητα τους αλλοιώνουν την όλη εικόνα της προσβολής.

Χαρακτηριστικό σύμπτωμα της βαρροϊκής ακαρίασης είναι η παρουσία εργατριών με μειωμένη “τριχοφυΐα” και ζαρωμένα φτερά, μέσα και έξω από τις κυψέλες (εικ. 8). Όταν η προσβολή ξεπεράσει το 30%, η παρουσία των ακάρεων επάνω στις ενήλικες μέλισσες είναι εμφανής. Οι παρασιτούμενες μέλισσες φέρουν 1-3 βαρρόα, συνήθως ανάμεσα στα δαχτυλίδια της κοιλιάς, σπανιότερα στη ράχη ή σε άλλα σημεία του σώματος τους. Στο στάδιο αυτό παρατηρούνται μπροστά από τις κυψέλες πολλές μέλισσες με τις ανατομικές ανωμαλίες που προαναφέρθηκε. Η κατάσταση αυτή παρατηρείται συνήθως μετά το μήνα Ιούλιο επειδή την περίοδο αυτή η εκτροφή του γόνου περιορίζεται σημαντικά και η πληθυσμιακή αναλογία παρασίτου προς ξενιστή μεταβάλλεται συνεχώς υπέρ του πρώτου.

Ο ρυθμός ανανέωσης των μελισσών διαταράσσεται και ο πληθυσμός του μελισσιού μειώνεται συνεχώς. Οι κηφήνες ελαττώνονται σε βαθμό που να δημιουργείται δυσαναλογία των φύλων. Οι έντονα μολυσμένες κυψέλες εξασθενούν και συχνά γίνονται θύματα λεηλασίας από τα πιο δυνατά μελίσσια. Πολλά από αυτά τα μελίσσια εγκαταλείπουν τον έντονα προσβεβλημένο γόνο και φεύγουν να βρουν αλλού κατοικία. Συχνά δίνουν την εντύπωση ότι σμηνουργούν μέσα στο φθινόπωρο. Άλλα μελίσσια δεν καταφέρνουν να διαχειμάσουν και χάνονται στη διάρκεια του χειμώνα ή τις αρχές της άνοιξης. Η απώλεια μελισσιών στα οποία υπάρχουν σημαντικές προμήθειες αλλά ελάχιστες νεκρές μέλισσες, είναι μια εικόνα που παρατηρείται αρκετά συχνά στο τέλος του χειμώνα σε έντονα προσβεβλημένα από Βαρροϊκή Ακαρίαση μελισσοκομεία.

Η σειρά εμφάνισης των συμπτωμάτων σε μια κυψέλη είναι:

1. Γόνος διασκορπισμένος (κοινό σύμπτωμα με άλλες ασθένειες ή άλλες αιτίες).
2. Προνύμφες σε ανώμαλη θέση και παρουσίαση άτυπων σηψιγονιών.
3. Εμφάνιση ακμαίων μελισσών με ανώμαλη μορφολογία (ανώμαλη διάταξη πτερών ή και κατεστραμμένα, κοντές κοιλιές), νευρικές και με μειωμένη ικανότητα πτήσης (τρέχουν μπροστά στην κυψέλη και στη συνέχεια πετούν άτακτα ή αδυνατούν να πετάξουν).
4. Κατακόρυφη πτώση της ανάπτυξης των μελισσών (μεγάλη μείωση του πληθυσμού).
5. Τα ακάρεα είναι εμφανή πάνω στις μέλισσες με την πρώτη ματιά .
6. Νεκρές νύμφες μπροστά στην κυψέλη, πλήθος μελισσών με κομμένα φτερά να περπατούν ή να είναι νεκρές μπροστά στην κυψέλη.
7. Εγκατάλειψη της κυψέλης-θάνατος του μελισσοσμήνους. Στην κυψέλη υπάρχουν τα αποθέματα μελιού τα οποία καθώς επισκέπτονται οι λεηλάτριες μέλισσες, μολύνονται κι αυτές από τα ακάρεα που κυκλοφορούν πάνω στα πλαίσια αυτά (Υφαντίδης, 1987).

ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η έγκαιρη διάγνωση του παρασίτου έχει σημασία μόνο στις περιοχές που αυτό πρωτοεμφανίζεται. Επιτρέπει την έγκαιρη λήψη μέτρων που παρεμποδίζουν την εξάπλωση του και δίνουν χρόνο να εκπαιδευτούν οι μελισσοκόμοι για να το αντιμετωπίσουν. Σε περιοχές που το άκαρι ενδημεί, ο έλεγχος της έντασης της προσβολής είναι μεγάλης σημασίας, γιατί απ' αυτή εξαρτάται αν θα εφαρμοσθεί ή όχι θεραπευτική αγωγή.

Η διαπίστωση της έντασης της προσβολής σε ένα μελισσοκομείο γίνεται είτε με τη διαγνωστική θεραπεία, είτε με την καταμέτρηση των βαρρόα που πέφτουν στον πυθμένα της κυψέλης.

Διαγνωστική θεραπεία: Στον πυθμένα των κυψελών ενός αριθμού μελισσιών του μελισσοκομείου τοποθετείται ένα άσπρο χαρτόνι. Στη συνέχεια γίνεται θεραπεία με ένα ακαρεοκτόνο και μετά από 24 ώρες καταμετρούνται τα βαρρόα που έπεσαν στο χαρτόνι. Από τον αριθμό των βαρρόα σε συνάρτηση με

την έκταση του γόνου συμπεραίνουμε για την ένταση της προσβολής. Πρέπει να τονισθεί ότι όταν το μελίσσι εκτρέφει γόνο, το 50-85% των βαρρόα βρίσκεται στο σφραγισμένο γόνο και δεν επηρεάζονται από τη θεραπεία.

Καταμέτρηση των βαρρόα που πέφτουν στον πυθμένα: Σ' ένα αριθμό μελισσιών του μελισσοκομείου τοποθετείται ειδικός πυθμένας με συρμάτινο πλέγμα, που επιτρέπει την παγίδευση των βαρρόα που πέφτουν. Η καθημερινή ή εβδομαδιαία καταμέτρησή τους επιτρέπει τον κατά προσέγγιση υπολογισμό της έντασης της προσβολής. Η ανεύρεση κατά μέσο όρο 10 βαρρόα κάθε ημέρα, σημαίνει ότι το μελίσσι έχει σημαντική προσβολή και χρειάζεται άμεση θεραπεία.

Διάγνωση στο εργαστήριο: Γίνεται με την εξέταση δείγματος γόνου ή ζωντανών μελισσών. Ο γόνος αποσφραγίζεται κατά προτίμηση κάτω από το στερεοσκόπιο και αναζητούνται ενήλικα βαρρόα και ανώριμα στάδια πάνω στο γόνο και στα τοιχώματα των κελιών. Οι μέλισσες τοποθετούνται σε ευρύστομο γυάλινο δοχείο και ναρκώνονται με διοξείδιο του άνθρακος ή μικρή ποσότητα αιθέρα. Τα βαρρόα εγκαταλείπουν τις ναρκωμένες μέλισσες και βαδίζουν στα τοιχώματα του δοχείου.

Εκτίμηση με οινόπνευμα και ζωντανές μέλισσες. Τοποθετούνται τουλάχιστον 100 ζωντανές μέλισσες σε ένα δοχείο που περιέχει οινόπνευμα 30%. Ακολουθεί ανακίνηση του δοχείου και στη συνέχεια πέρασμα του περιεχομένου του από διπλό κόσκινο, το πρώτο συγκρατεί τις μέλισσες ενώ το δεύτερο τα βαρρόα. Μετά τον διαχωρισμό, γίνεται καταμέτρηση των βαρρόα και υπολογισμός του ποσοστού % που αντιστοιχεί στις 100 μέλισσες.

Η ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΒΑΡΡΟΑ

Μέχρις ότου το μελίσσι βρει το ίδιο τον τρόπο ν' αντισταθεί στο παράσιτο, οι μελισσοκόμοι είναι υποχρεωμένοι να φροντίσουν ώστε ο αριθμός των παρασίτων στα μελίσσια να παραμείνει σε τόσο χαμηλά επίπεδα, ώστε να μη μειώνεται η παραγωγή των μελισσιών.

Ο καλύτερος τρόπος για να απαλλαγεί η μελισσοκομία από τις τόσο σοβαρές επιπτώσεις του βαρρόα είναι το μελίσσι να βρει τον τρόπο το ίδιο να αντισταθεί. Μια τέτοια διεργασία όμως απαιτεί πολύ χρόνο.

Η αντίσταση στο παράσιτο, δεν εκδηλώνεται με τον ίδιο τρόπο από όλα τα είδη μελισσών. Από έρευνες που έχουν γίνει έχει παρατηρηθεί ότι η *Apis cerana* έχει την ιδιότητα να αυτοκαθαρίζεται πολύ γρήγορα από τα *Varroa*.

Αλλά και οι ίδιοι οι μελισσοκόμοι θα πρέπει να προβαίνουν σε τακτικούς δειγματοληπτικούς αλλά και συνολικούς ελέγχους.

Θα πρέπει ιδιαίτερα να τονισθεί ότι, ένεκα της ιδιομορφίας που εμφανίζει το σοβαρό αυτό παράσιτο και της ανάγκης τακτικού ελέγχου των μελισσοσμηνών, δεν είναι ούτε πρακτικό, αλλά ούτε και εφικτό ο έλεγχος να γίνεται με την αποστολή δειγμάτων στα εργαστήρια, αλλά θα πρέπει να γίνεται με επιτόπιες εξετάσεις, πράγμα που μπορεί και συνιστάται να κάνει ο ίδιος ο μελισσοκόμος.

Ο έλεγχος γίνεται ανάλογα με την εποχή ή με την εξέταση γόνου και ιδιαίτερα κηφηνογόνου, εάν υπάρχει, ή με επέμβαση με ένα από τα ακαρεοκτόνα που χρησιμοποιούμε για τη θεραπεία της ασθένειας. Στη πρώτη περίπτωση εξετάζουμε τα σκεπασμένα κελιά ανοίγοντας αυτά με μια βελόνα ή καρφίτσα και ερευνούμε για τον εντοπισμό ακάρεων (ακμαίων ή προνυμφικών σταδίων) πάνω στις ώριμες προνύμφες ή νύμφες ή στα τοιχώματα και στους πυθμένες των κελιών.

Από την προσεκτική και εμπειριστατωμένη μελέτη της βιολογίας του ακάρεος, για την οποία πολλά στοιχεία δόθηκαν πιο πάνω, προκύπτουν δύο βασικά και σημαντικά συμπεράσματα, που έχουν σχέση τόσο με την καλύτερη και πιο αποτελεσματική αντιμετώπιση του, όσο και με την συγκριτική αξιολόγηση των μέσων και φαρμάκων που χρησιμοποιούνται γι' αυτή. Αυτά είναι: α) η καλύτερη περίοδος, για την αντιμετώπιση του παρασίτου, είναι η περίοδος που δεν υπάρχει καθόλου γόνος (χειμώνας) ή υπάρχει πολύ λίγος, γιατί τότε ως γνωστό, το άκαρι δεν αναπαράγεται και βρίσκεται στους χαμηλότερους πληθυσμούς του και β) εάν κατορθώσουμε να δημιουργήσουμε ένα τοξικό περιβάλλον για τα ακάρια, για 14 τουλάχιστον συνεχείς ημέρες, όσος δηλαδή είναι και ο χρόνος που τα κελιά με το γόνο είναι κλειστά και διαρκεί ο αναπαραγωγικός κύκλος του ακάρεος, τότε θεωρητικά επιτυγχάνουμε την καλύτερη αντιμετώπιση του.

Παρά την πληθώρα των μεθόδων και των φαρμάκων που έχουν προταθεί ως τώρα, η καταπολέμηση της Βαρροϊκής ακαρίασης δεν είναι εύκολη υπόθεση. Έχουν προταθεί διάφορες μέθοδοι αντιμετώπισης του ακάρεος όπως βιολογικές, φυσικές, μηχανικές, μελισσοτεχνικές και χημειοθεραπευτικές.

Βιολογικές μέθοδοι-βιολογικά σκευάσματα

Στοχεύουν στην αντιμετώπιση του βαρρόα χωρίς τη χρήση φυτοπροστατευτικών ουσιών.

Επιλογή ανθεκτικών μελισσιών. Στις μέρες μας γίνεται σημαντική έρευνα στον τομέα της επιλογής ανθεκτικών στο βαρρόα μελισσών. Τα βασικά κριτήρια επιλογής είναι ο πληθυσμός των βαρρόα, η διασπορά τους στις μέλισσες και το γόνο, η υγιεινή συμπεριφορά του μελισσιού και το ένστικτο καθαρισμού. Όταν ένα μελίσσι πληροί τα κατάλληλα κριτήρια, επιλέγεται και ελέγχονται άλλα σημαντικά χαρακτηριστικά αυτού, όπως η παραγωγή μελιού, η ημερότητα, η προσήλωση των μελισσών στα πλαίσια και η τάση για σμηνουργία. Αν και σε αυτά τα χαρακτηριστικά το μελίσσι είναι καλό, τότε προτιμάται και γίνεται παραπέρα μελέτη. Σε τελικό στάδιο, παράγονται ανθεκτικά μελίσσια και πωλούνται στους παραγωγούς.

Κάποια χαρακτηριστικά που δείχνουν πιθανή ανθεκτικότητα στο βαρρόα είναι τα εξής:

- Οι μέλισσες ανοίγουν το σφραγισμένο γόνο και απομακρύνουν τις προσβεβλημένες νύμφες.
- Οι μέλισσες απομακρύνουν τα βαρρόα και τα σκοτώνουν δαγκώνοντάς τα.
- Μείωση του χρόνου από το σφράγισμα του κελιού μέχρι την έξοδο της μέλισσας. Έτσι, μειώνεται ο χρόνος που έχουν τα βαρρόα για να πολλαπλασιαστούν. Βέβαια, αν γίνει κάτι τέτοιο, είναι πιθανό τα βαρρόα να προσαρμοστούν και να αναπτύσσονται πιο γρήγορα.
- Μείωση της διαμέτρου των εργατικών κελιών, οπότε η μέλισσα βγαίνει γρηγορότερα.
- Μείωση της ελκυστικότητας του γόνου στα θηλυκά βαρρόα.
- Μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας των βαρρόα.
- Αύξηση του χρόνου παραμονής πάνω στις μέλισσες. Τα βαρρόα δεν αναπαράγονται, ενώ παράλληλα είναι εκτεθειμένα στα διάφορα φάρμακα που εφαρμόζει ο μελισσοκόμος.

Παγίδευση στον κηφηνογόνο. Στηρίζεται στην ιδιαίτερη προτίμηση που δείχνει το βαρρόα στον κηφηνογόνο. Έχει υπολογιστεί ότι ο κηφηνογόνος προτιμάται 12 φορές περισσότερο από ότι ο εργατικός γόνος. Αυτό οφείλεται στις ουσίες που εκκρίνονται από το γόνο λίγο πριν αυτός σφραγιστεί.

Μία ή δύο κηφηνοκηρήθρες τοποθετούνται στο κέντρο της γονοφωλιάς και όταν γεμίσουν με σφραγισμένο κηφηνογόνο απομακρύνονται. Ο γόνος καταστρέφεται μαζί με τα βαρρόα που έχουν παγιδευτεί εκεί. Η εργασία αυτή πρέπει να επαναλαμβάνεται συχνά και έχει ικανοποιητικά αποτελέσματα, μόνο όταν η μόλυνση βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα.

Παγίδευση στον εργατικό γόνο. Η βασίλισσα περιορίζεται με κηρηθοθήκη και αναγκάζεται να ωτοκήσει επί 18 ημέρες σε δύο μόνο κηρήθρες. Τα βαρρόα στο διάστημα αυτό εισέρχονται αναγκαστικά να ωτοκήσουν στις δύο μοναδικές κηρήθρες με γόνο. Όταν ο γόνος σφραγισθεί, η βασίλισσα ελευθερώνεται, ο γόνος απομακρύνεται και καταστρέφεται μαζί με τα βαρρόα που παγιδεύτηκαν. Η μέθοδος αυτή είναι πολύ περισσότερο αποτελεσματική, επειδή περιορίζει κατά πολύ τον πληθυσμό του βαρρόα. Ο περιορισμός όμως της βασίλισσας επί 18 ημέρες και η καταστροφή δύο πλαισίων με γόνο διαταράσσει έντονα τη ζωή του μελισσιού.

Αιθήρια έλαια. Η χρήση αιθέριων ελαίων προτείνεται από κάποιους ερευνητές. Σε πειράματα που έγιναν, δοκιμάστηκαν 16 αιθήρια έλαια σε εργαστηριακές συνθήκες για την αποτελεσματικότητα τους στη θανάτωση του *Varroa destructor* αλλά και για την ενδεχόμενη τοξικότητα στις μέλισσες. Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν μόνο ενήλικες μέλισσες φέρουσες ενήλικα ακάρεα. Ορισμένα αιθήρια έλαια (ρίγανη, πεύκο) ήταν απολύτως αδιάφορα τόσο στο βαρρόα όσο και στις μέλισσες. Αντίθετα, άλλα (αψιθιά, ευκάλυπτος) ήταν μεν αποτελεσματικά για την αντιμετώπιση του βαρρόα αλλά είναι πολύ τοξικά στις μέλισσες. Άλλα (κέδρος, δάφνη, μέντα, δυόσμος, μυρτιά, ροσμαρί, θρούμπη) είναι σχετικά αποτελεσματικά για το βαρρόα (> 75%) αλλά σχετικά τοξικά στις μέλισσες (> 10%). Τέλος ένας μικρός αριθμός αιθέριων ελαίων (θυμάρι, λεβάντα, ήμερο και άγριο φασκόμηλο) φέρνουν μεγάλη θνησιμότητα στα βαρρόα και δεν έχουν επίδραση στη βιωσιμότητα των μελισσών. Από τα αιθήρια έλαια που δοκιμάστηκαν, τα πιο δραστικά συστατικά ήταν το *π*-κυμένιο,

το γ-τερπινένιο, η θυμόλη, η καρβακρόλη, η 1,8-κινεόλη και οι θυυγιόνες (Αεράκη 2006).

Φυσικές μέθοδοι

Θερμοθεραπεία. Συνίσταται στη χρήση θερμοκρασιών υψηλότερων των 40 °C επί μικρό χρονικό διάστημα επάνω στις ενήλικες μέλισσες ή 44-45 °C επί 4-5 ώρες στο γόνο. Οι μέλισσες δεν σκοτώνονται ούτε η διάρκεια της ζωής τους μειώνεται. Έχουν προταθεί διάφορες τεχνικές, όλες όμως απαιτούν ειδικό εξοπλισμό, μεγάλη προσοχή και επιδεξιότητα. Δεν είναι εύκολο να εφαρμοσθούν στην πράξη (Αεράκη 2006).

Μηχανικές μέθοδοι

Σκόνισμα. Πενήντα περίπου γραμμάρια πούδρας ή άλλης λεπτής αδρανούς σκόνης, σκονίζονται επάνω στις μέλισσες. Οι λεπτές σκόνες κολλάνε επάνω στα πόδια των βαρρόα, με αποτέλεσμα αυτά να μην μπορούν να συγκρατηθούν επάνω στις μέλισσες και να πέφτουν στον πυθμένα της κυψέλης.

Χρήση πλέγματος στον πυθμένα. Η χρήση αυτού του πλέγματος μπορεί να βοηθήσει την κατάσταση. Τα βαρρόα, που πέφτουν φυσιολογικά στον πυθμένα της κυψέλης, μπορούν εύκολα να ανέβουν ξανά στις μέλισσες. Αν, όμως, υπάρχει το πλέγμα, οι μέλισσες δεν μπορούν να περάσουν έτσι τα βαρρόα δεν ξανάρχονται σε επαφή με αυτές και, είτε πεθαίνουν από ασπία, είτε τα τρώνε τα μυρμήγκια.

Κάπνισμα του μελισσιού. Η χρήση του πλέγματος μπορεί να συνδυαστεί με κάπνισμα του μελισσιού, οπότε πέφτουν περισσότερα βαρρόα. Ακόμη καλύτερα αποτελέσματα λαμβάνονται αν αντί για πλέγμαβάλουμε κολλητικό χαρτί στον πυθμένα της κυψέλης (Αλυσσανδράκης & Χαριζάνης, 2001).

Πρόληψη σμηνουργίας-Αποφυγή λεηλασίας. Η σμηνουργία οδηγεί στη δημιουργία νέων μελισσιών τα οποία είναι πολύ πιθανό να έχουν υψηλό ποσοστό προσβολής από βαρρόα. Αυτά εξασθενούν ευκολότερα και ακολούθως λεηλατούνται. Με αυτό τον τρόπο τα βαρρόα μεταδίδονται σε υγιή μελίση (Αεράκη 2006).

Χημική καταπολέμηση

Παρουσιάζει το σοβαρό μειονέκτημα της ρύπανσης του μελιού και του κεριού με τοξικά κατάλοιπα και την πιθανότητα οξείας ή χρόνιας τοξικότητας του μελισσιού. Παρόλα αυτά, αποτελεί τον αποτελεσματικότερο τρόπο αντιμετώπισης του βαρρόα σε ολόκληρο τον κόσμο. Σχετικά με την χημειοθεραπεία του παρασίτου έχουμε να παρατηρήσουμε τα εξής:

i) Τα ακαρεοκτόνα ή και εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται είναι τοξικά και για τις ίδιες τις μέλισσες και μάλιστα εφαρμόζονται κατευθείαν μέσα στην κυψέλη. Έτσι ο κίνδυνος απωλειών για τα μελίσσια είναι αμεσότερος σε σύγκριση π.χ. με εκείνον που διατρέχουν αυτά από τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη φυτοπροστασία.

ii) Η αλόγιστη εφαρμογή χημικών ουσιών μέσα στην κυψέλη αυξάνει τη συχνότητα ρύπανσης του μελιού και θέτει σε ενδεχόμενο κίνδυνο την υγεία του καταναλωτικού κοινού.

iii) Έχει αποδειχτεί ότι τα ακάρεα έχουν την ικανότητα να παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα φάρμακα. Στην Ελλάδα υπήρχε διαπιστωμένη ανθεκτικότητα στη δραστική ουσία fluvalinate, ενώ με τη παρούσα μελέτη αποδεικνύεται ότι υπάρχει ανθεκτικότητα και στη δραστική ουσία coumaphos.

Υπάρχουν εντομοκτόνα με ακαρεοκτόνο δράση όπως οργανοφωσφορικές και καρβαμιδικές ενώσεις, πυρεθρινοειδή και ακαρεοκτόνα που στοχεύουν τους υποδοχείς της οκταπαμίνης (*amitraz*). Η δράση των περισσότερων εντομοκτόνων εντοπίζεται στο νευρικό σύστημα. Τα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμιδικά εντομοκτόνα δεσμεύονται στο ενεργό κέντρο της ακετυλοχολινεστεράσης (βασικό ένζυμο του κεντρικού νευρικού συστήματος των εντόμων και των ακάρεων) αναστέλλοντας την λειτουργία της, είναι αποτελεσματικά κυρίως εναντίων των τέλειων μορφών. Η ακετυλοχολινεστεράση καταλύει την μετατροπή της ακετυλοχολίνης σε χολίνη οπότε διακόπτεται η μεταφορά μηνυμάτων και αχρηστεύεται το νευρικό σύστημα. Κάθε αίτιο που προκαλεί αναστολή της δράσης της χολινεστεράσης ή δεσμεύει τους μετασυνεπτικούς υποδοχείς της ακετυλοχολίνης, έχει ως αποτέλεσμα την υπερβολική παρουσία ακετυλοχολίνης, με συνέπεια τον διαρκή νευρικό ερεθισμό, ακολουθεί παράλυση του νευρικού συστήματος και θάνατος των εντόμων (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

Τα πυρεθρινοειδή δρουν στοχεύοντας στα διαμεμβρανικά κανάλια μεταφοράς νατρίου (*sodium channel*) αποσυντονίζοντας έτσι την λειτουργία τους και τον έλεγχο ροής ιόντων κατά μήκος του νευρικού άξονα οδηγώντας στην παράλυση και σταδιακά στο θάνατο των ατόμων (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

Το *Amitraz* είναι ακαρεοκτόνο με δραστική ουσία την αμιπράζη. Η αμιπράζη έχει εντομοαπωθητική και εντομοκτόνο δράση στοχεύοντας τους υποδοχείς οκταπαμίνης του κεντρικού νευρικού συστήματος ενώ παρεμποδίζει την σύνθεση μονοαμινοοξειδασών και προσταλαγδίνης. Οδηγεί τα έντομα σε υπερδιέγερση, ακολουθεί η παράλυση και σταδιακά ο θάνατος.

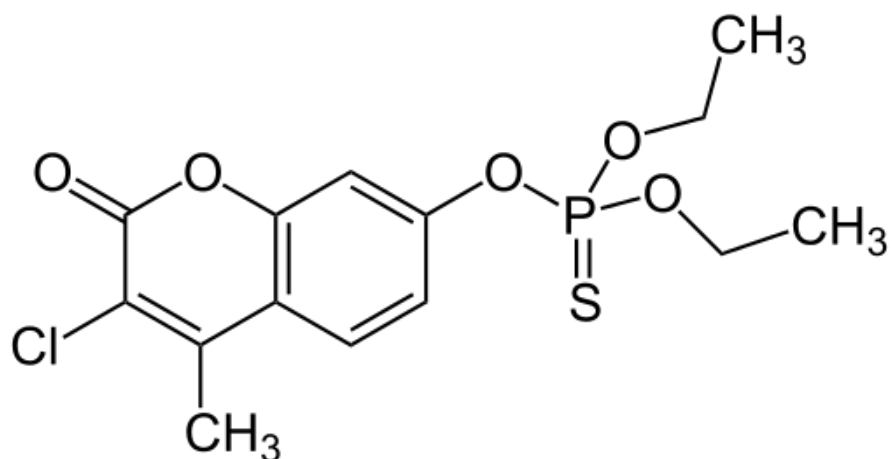
Coumaphos

Το *coumaphos* είναι μία οργανοφωσφορική ένωση που δρα ως εντομοκτόνο και αναστέλλει τη δράση της χολινεστεράσης με φωσφορυλίωση της εστερικής περιοχής της, προκαλώντας συσσώρευση της ακετυλοχολίνης στη νευρομυϊκή σύναψη. Αυτό οδηγεί σε συνεχή διέγερση του παρασίτου το οποίο καταλήγει σε σπαστική παράλυση. Χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση πολλών εντόμων συμπεριλαμβανομένων και των παρασιτικών ακάρεων (*Varroa destructor*). Χρησιμοποιείται έναντι εκτοπαρασίτων, τα οποία είναι έντομα ζουν ένα μέρος ή και ολόκληρη τη ζωή τους πάνω σε έναν ξενιστή (π.χ μέλισσα). Λόγω της χαμηλής τοξικότητας του στα ψάρια χρησιμοποιείται και για την αντιμετώπιση προνυμφών κουνουπιών. Το *coumaphos* αποτελεί επιλεκτικό εντομοκτόνο επειδή σκοτώνει συγκεκριμένα έντομα-στόχους την ώρα που παρασιτούν άλλους οργανισμούς μη-στόχους.

Στην Ελλάδα αποτέλεσαι ένα από τα πρώτα όπλα των ελλήνων μελισσοκόμων με το σκεύασμα *Asuntol* ενώ πλέον κυκλοφορεί υπό τη μορφή υγρού σκευάσματος (*Perizin*) και υπό τη μορφή ταινιών εμποτίσμενες με τη δραστική ουσία, οι οποίες τοποθετούνται ανάμεσα στον γόνο (*CheckMite+*).

ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ:

- **Χημικός τύπος:** $C_{14}H_{16}ClO_5PS$.
- **Μοριακή μάζα:** 362.766 g/mol.
- **Διαλυτότητα:** Αδιάλυτο στο νερό, ελάχιστα διαλυτό στην αιθανόλη και την ακετόνη, διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες



Εικόνα 9 : Συντακτικός τύπος του οργανοφωσφορικού *coumaphos*

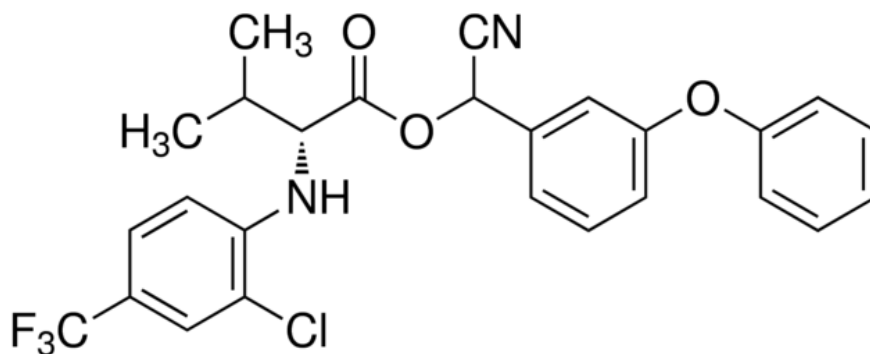
τ-Fluvalinate

Το *τ-Fluvalinate* είναι ένα συνθετικό πυρεθροειδές και η δράση του συνίσταται στις αλλαγές διαπερατότητας των καναλιών νατρίου στις μεμβράνες των νευρών, προκαλώντας παρατεταμένη εκπόλωση. Επηρεάζει το κεντρικό και το περιφερικό σύστημα του εντόμου προκαλώντας παράλυση. Χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση πολλών εντόμων (αφίδες, θρίπες, τετράνυχος) συμπεριλαμβανομένου και του εκτοπαράσιτου των μελισσών *Varroa destructor*. Είναι πολύ τοξικό για τους υδρόβιους οργανισμούς.

Στην Ελλάδα κυκλοφόρησε τα παλαιότερα χρόνια με το σκεύασμα *Mavrik* ενώ πλέον κυκλοφορεί με τη μορφή του *Apistan*.

ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ:

- **Χημικός τύπος:** $C_{26}H_{22}ClF_3N_2O_3$.
- **Μοριακή μάζα:** 502.913 g/mol
- **Διαλυτότητα:** Πολύ χαμηλή στο νερό, διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες και αρωματικούς υδρογονάνθρακες.



Εικόνα 10 : Συντακτικός τύπος του πυρεθρινοειδούς *τ-Fluvalinate*

Amitraz

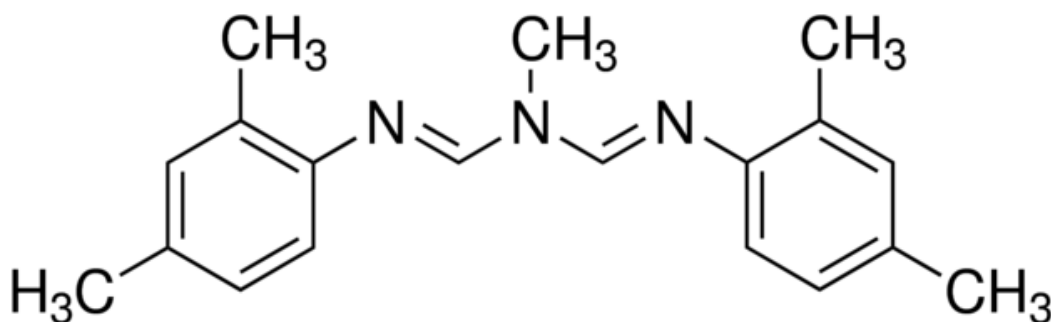
Το *amitraz* είναι εξαπαραιοτοκτόνο που ανήκει στην οικογένεια των Φορμαμιδινών ενώ δρα και σαν ακαρεοκτόνο. Αναστέλλει την μονοάμινο οξειδάση και είναι αγωνιστής των υποδοχέων της οκταπαμίνης. Η μονοάμινο οξειδάση μεταβολίζει τους μονοαμινικούς νευροδιαβιβαστές σε έντομα και η οκταπαμίνη μεταβάλλει τις τονικές συσπάσεις στους μύες του παρασίτου (Χατζληνα 2013).

Είναι μη εγκεκριμένη ουσία για την Ελλάδα, παρόλα αυτά έχει μεγάλη απήχηση απο τους μελισσοκόμους λόγω της αποτελεσματικότητας που έχει τον έλεγχο του *Varroa destructor*. Τα σκευάσματα με τα οποία έχει κυκλοφορήσει στην Ελλάδα είναι τα: Apiwar, Apiwarol, Biowar, Varataz, Varachet forte, Varietol fum, Varidol, Tak-Tik, Mitac.

ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ:

- **Χημικός τύπος:** $C_{19}H_{23}N_3$.
- **Μοριακή μάζα:** 293.41 g/mol.
- **Διαλυτότητα:** Αδιάλυτο στο νερό.

Αυξημένη σε κοινούς οργανικούς διαλύτες όπως η ακετόνη και η ξυλένη.



Εικόνα 11 : Συντακτικός τύπος της φορμαμιδίνης Αμιτράζης (*amitraz*)

Η ανθεκτικότητα εντόμων και ακάρεων στα εντομοκτόνα

Η ανθεκτικότητα είναι ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα στην προσπάθεια ελέγχου των επιβλαβών για την μελισσοκομία παρασίτων. Είναι

κληρονομούμενη ιδιότητα και ορίζεται ως η ικανότητα ενός πληθυσμού να επιβιώνει μετά από έκθεση σε δόσεις δραστικής ουσίας που κανονικά θα ήταν θανατηφόρες. Πριν την εφαρμογή ενός προστατευτικού προϊόντος ο πληθυσμός του στοχευόμενου παρασίτου είναι ετερογενής, δηλαδή στο σύνολο του πληθυσμού απαντούν ευαίσθητα και ανθεκτικά άτομα. Με την πίεση της επιλογής επιλέγονται τα ανθεκτικά γονίδια ενώ τα ευαίσθητα θανατώνονται. Με αυτόν τον τρόπο, την πάροδο των γενεών, αρχικά ευπαθείς πληθυσμοί μετατρέπονται σε ανθεκτικούς (Βόντας κ.α., 2007) .

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας οδηγεί σε απώλεια της αποτελεσματικότητας των φαρμάκων. Η λανθασμένη χρήση των προστατευτικών προϊόντων οδηγεί σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας, επιβαρύνοντας οικονομικά τόσο τον παραγωγό και τον καταναλωτή, όσο και το περιβάλλον.

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα ακάρεα ευνοείται από το υψηλό αναπαραγωγικό τους δυναμικό, τον σύντομο βιολογικό τους κύκλο και τον μεγάλο αριθμό γενεών ανά έτος. Τα προβλήματα ανθεκτικότητας του *Varroa destructor* είναι ιδιαίτερα αυξημένα λόγω του μικρού αριθμού δραστικών ουσιών που μπορούν να χρησιμοποιήσουν οι μελισσοκόμοι, τις εναλλαγές που μπορούν να κάνουν καθώς και των συχνών εφαρμογών φαρμάκων.

Για την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας χρειάζεται λεπτομερής επιστημονική προσέγγιση. Απαιτούνται μελέτες τόσο στο εργαστήριο όσο και στον αγρό για την κατανόηση της ανθεκτικότητας, την αντιμετώπισή της και τον κίνδυνο εμφάνισής της. Απαιτείται προσδιορισμός των παραμέτρων της ανθεκτικότητας, όπως του επιπέδου ανθεκτικότητας, της κατανομής του πληθυσμού, της ύπαρξης διασταυρωτής ανθεκτικότητας, των βιοχημικών μηχανισμών ανθεκτικότητας, του γενετικού ελέγχου της ανθεκτικότητας και της προσαρμοστικότητας των ανθεκτικών πληθυσμών (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

Απαραίτητη προϋπόθεση για την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας είναι η έγκαιρη διάγνωση της και η παρακολούθηση των πληθυσμών για τον έλεγχο της κατανομής των ανθεκτικών γονιδίων. Η γνώση του μεγέθους της γενετικής διαφοροποίησης των πληθυσμών ενός είδους συμβάλει στην επιλογή της στρατηγικής είτε για την καθυστέρηση εμφάνισης είτε για την διαχείριση της ανθεκτικότητας. Η παρακολούθηση του φαινομένου στον αγρό παίζει καθοριστικό ρόλο στην αντιμετώπιση.

Η αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας εστιάζεται στον περιορισμό της επιλεκτικής πίεσης των εντομοκτόνων. Για να επιτευχθεί αυτό απαιτείται ρύθμιση της δόσης εντομοκτόνων και του αριθμού των επεμβάσεων, χρησιμοποίηση εντομοκτόνων χαμηλής υπολειμματικής διάρκειας, χρησιμοποίηση συνεργιστικών ουσιών, εφαρμογή τοπικών επεμβάσεων καθώς και η σωστή εναλλαγή εντομοκτόνων.

Στην Ελλάδα έχει αναφερθεί ανθεκτικότητα πληθυσμών *Varroa* που προέρχονταν από το Ηράκλειο Κρήτης και την Αρκαδία στα πυρεθρινοειδή. Τα αποτελέσματα έδειξαν την παρουσία δυο μεταλλαγών που συνδέονται με ανθεκτικότητα στις πυρεθρίνες στις θέσεις L925I και L925V. (Allisandrakis 2015).

Μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα και ακαρεοκτόνα

Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα έντομα και στα ακάρεα εμφανίζονται σε διάφορες μορφές. Ανθεκτικότητα μπορεί να προκαλείται από επιδερμικές διαφοροποιήσεις και αλλαγές στην συμπεριφορά τους που έχουν ως αποτέλεσμα είτε να εμποδίζεται η είσοδος είτε να αυξάνεται η απέκκριση των εντομοκτόνων-ακαρεοκτόνων. Αυτός ο τύπος ανθεκτικότητας ονομάζεται φυσιολογική ή ηθολογική ανθεκτικότητα.

Ένας δεύτερος μηχανισμός ανθεκτικότητας είναι η βιοχημική ανθεκτικότητα, η οποία συνίσταται από ένζυμα που μεταβολίζουν τα εντομοκτόνα και ακαρεοκτόνα προτού αυτά φτάσουν στους στόχους τους. Βασικά ένζυμα της βιοχημικής ανθεκτικότητας είναι οι εστεράσες, οι μικτής λειτουργίας P450 οξειδάσες και οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης (Βόντας κ.α., 2007).

Οι εστεράσες (καρβοξυλεστεράσες), αποτελούν βασικά ένζυμα της βιοχημικής ανθεκτικότητας, είναι μια μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών μέλη της οποίας δεσμεύουν και κατακρατούν εντομοκτόνα μόρια στον εξωκυταρικό χώρο υδrolύοντας συνήθως αργά εστερικούς δεσμούς (Hemingway and Karunaratne, 1998). Οι εστεράσες προκαλούν ανθεκτικότητα σε όλες σχεδόν τις ομάδες εντομοκτόνων, συνηθέστερα όμως στα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμιδικά. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου η ανθεκτικότητα δημιουργείται εξαιτίας ποιοτικής διαφοροποίησης εστερασών, αποτέλεσμα επιλογής ενζύμων με αυξημένη

καταλυτική ικανότητα για τα εντομοκτόνα μόρια. Συνήθως όμως η ανθεκτικότητα οφείλεται σε επιλογή ατόμων που διαθέτουν μεγάλες ποσότητες της πρωτεΐνης, κάτι που συνήθως επιτυγχάνεται με τον μηχανισμό της γονιδιακής ενίσχυσης (Guillemaud et al., 1999, Vontas et al., 2000, Kim et al., 2004).

Μια άλλη σημαντική οικογένεια γονιδίων που προκαλεί βιοχημική ανθεκτικότητα είναι οι μικτής λειτουργίας P450 οξειδάσες ή μονοοξυγενάσες. Πρόκειται για μικροσωμικές αιμοπρωτεΐνες που καταλύουν την οξειδωτική διάσπαση των εντομοκτόνων. Για την μειωμένη ευαισθησία των εντόμων ευθύνονται ποσοτικές αλλαγές μελών της οικογένειας που έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν τα μόρια των εντομοκτόνων ουσιών και σπανίως ποιοτικές διαφοροποιήσεις (Van Leeuwen et al., 2005). Ανθεκτικότητα αναφέρεται σε όλες σχεδόν τις ομάδες εντομοκτόνων, όπως οργανοφωσφορικά, πυρεθρινοειδή, οργανοχλωριωμένα, νεονικοτινοειδή και αβερμεκτίνες και συχνά έχουν ευρύ χαρακτήρα (έμμεση-πολλαπλή ανθεκτικότητα), αφού ορισμένες P450 οξειδάσες έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν ως υπόστρωμα και να μεταβολίζουν πολύ διαφορετικά τοξικά μόρια.

Η τρίτη ομάδα ενζύμων που εμπλέκονται στην βιοχημική ανθεκτικότητα είναι οι μεταφοράσες ή τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs). Τα ένζυμα αυτά καταλύουν την προσθήκη γλουταθειόνης στο λιπόφιλο μόριο των εντομοκτόνων αυξάνοντας την λιποδιαλυτότητα τους και διευκολύνοντας κατ'αυτόν τον τρόπο την αποβολή τους από τον οργανισμό. Σε μερικές περιπτώσεις τα ένζυμα αυτά μεταβολίζουν το εντομοκτόνο χωρίς την προσθήκη γλουταθειόνης στο τοξικό μόριο, κάτι που συμβαίνει στην αντίδραση αποϋδροχλωρίνωσης του DDT. Οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης προκαλούν σχετικά ήπια επίπεδα ανθεκτικότητας σε όλες σχεδόν τις κατηγορίες εντομοκτόνων (Vontas et al., 2001).

Οι προαναφερθέντες μηχανισμοί ανθεκτικότητας (φυσιολογική και βιοχημική ανθεκτικότητα) συντελούν στην μείωση της ποσότητας του εντομοκτόνου που φτάνει τελικά στον στόχο. Η τελευταία γραμμή άμυνας των εντόμων, που συχνά προκαλεί και τα πιο εντυπωσιακά επίπεδα ανθεκτικότητας, αφορά διαφοροποιήσεις στην μοριακή δομή των πρωτεϊνών στόχων που τις κάνουν λιγότερο ευαίσθητες στα τοξικά μόρια με αποτέλεσμα τη μείωση ή την απώλεια της αποτελεσματικότητας των εντομοκτόνων (Vontas et al., 2001).

Πρώτος ο Smissaert το 1964 απέδειξε ότι η μη ευαισθησία του ενζύμου στόχου ακετυλοχολινεστεράση ήταν ο κύριος μηχανισμός ανθεκτικότητας του στα οργανοφωσφορικά . Έκτοτε ο μηχανισμός αυτός ταυτοποιήθηκε σε πολλά έντομα και ακάρεα. Είναι πλέον γνωστό ότι αλλαγές στην στερεοδομή της AChE, συνήθως λόγω σημειακών μεταλλαγών στο κέντρο του ενζύμου, την καθιστούν λιγότερο προσπελάσιμη στα οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά εντομοκτόνα . Μελέτες που αφορούν αλλαγές στους στόχους των άλλων κατηγοριών φυτοπροστατευτικών ουσιών δεν έχουν γίνει στα ακάρεα. Στα έντομα αντιθέτως υπάρχουν τέτοιες μελέτες. Είναι γνωστό ότι αλλαγές στις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς ιόντων νατρίου και χλωρίου (τύπου kdr, knockdown resistance και rdl, resistance to dieldrin) μειώνουν την συνάφεια των εντομοκτόνων με τις πρωτεΐνες αυτές με αποτέλεσμα την μείωση της ευαισθησίας των εντόμων (French-Constant et al., 1994, Zlotkin 1999). Οι μεταλλαγές αυτές παρουσιάζονται ιδιαίτερα συντηρημένες και προσδίδουν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα που στοχεύουν στα πρωτεϊνικά αυτά κανάλια, όπως τα πυρεθρινοειδή και τα οργανοχλωριωμένα.

Αντικείμενο της εργασίας

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η αναζήτηση ύπαρξης ή μη ανθεκτικότητας του *Varroa destructor* στις δ.ο *coumaphos*, *amitraz*, *τ-fluvalinate*

καθώς και η διερεύνηση των επιπέδων της, όπου αυτή αναπτύχθηκε. Σκοπός είναι η παραγωγή διαγνωστικών για τη διαχείριση ανθεκτικότητας με απώτερο στόχο την καλύτερη αντιμετώπιση των προβλημάτων που δημιουργεί το *Varroa*. Η μεθοδολογία περιλαμβάνει την διερεύνηση των επιπέδων ανθεκτικότητας στις δ.ο *coumaphos*, *amitraz*, *τ-fluvalinate* φυσικών πληθυσμών *Varroa* με κλασικές μεθόδους βιοδοκιμών, εργαστηριακή επιλογή των ανθεκτικότερων πληθυσμών και χαρακτηρισμός – ανάλυση των μηχανισμών ανθεκτικότητας με την μέθοδο των βιοδοκιμών, με βιοχημικές και μοριακές μεθόδους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

A. Διερεύνηση των επιπέδων ανθεκτικότητας σε ακαρεοκτόνα πληθυσμών του *V.destructor* στην Ελλάδα με κλασικές μεθόδους βιοδοκιμών

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πληθυσμοί *V.destructor*

Η συλλογή των πληθυσμών πραγματοποιήθηκε με δειγματοληψίες απο μελισσοκομεία όπου υπήρχαν ενδείξεις και ιστορικό κατάλληλα για ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Οι ενδείξεις αφορούσαν παράπονα μελισσοκόμων ότι παρόλο που έκαναν θεραπείες τις ενδεικνυόμενες εποχές, αντιμετώπιζαν προβλήματα από τα *Varroa* και ότι τα σκεύασμα που χρησιμοποιούσαν δεν ήταν αρκετά αποτελεσματικά. Το ιστορικό των συγκεκριμένων μελισσοκόμων προδιάρθετε την πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας καθώς γινόντουσαν επαναλήψεις χρήσεως του ίδιου σκευάσματος ή τα περιθώρια εναλλαγών σκευασμάτων με διαφορετικές δραστικές ουσίες ήταν περιορισμένα.

Συλλέχθηκαν πληθυσμοί *Varroa* από την Άνδρο και από δυο διαφορετικά μελισσοκομεία της Νάξου που έχουν αρκετή απόσταση μεταξύ τους.

Πιο συγκεκριμένα, ο μελισσοκόμος απο την Άνδρο χρησιμοποιούσε ανελλιπώς τα τελευταία 12 χρόνια το σκεύασμα *CheckMite+* strips με δραστική ουσία το *coumaphos* και υπήρχαν έντονα παράπονα για την ύπαρξη ζωντανών ακάρεων ακόμα και πάνω στις ταινίες.

Ο μελισσοκόμος απο τον οποίο λήφθηκε το δείγμα *Naxos#A* τα τελευταία 5 χρόνια έκανε χρήση και περιορισμένες εναλλαγές μη εγκεκριμένων σκευασμάτων με δραστικές ουσίες το *amitraz* και το *coumaphos* ενώ τα προηγούμενα χρόνια η αντιμετώπιση γινόταν κυρίως με το σκεύασμα *Apistan* με δραστική ουσία το *r-fluvalinate*.

Ο μελισσοκόμος απο τον οποίο λήφθηκε το δείγμα *Naxos#B* έκανε και αυτός χρήση σκευασμάτων με δραστικές ουσίες το *amitraz* και το *coumaphos* τα τελευταία 5 χρόνια ενώ το ιστορικό είναι άγνωστο για τα προηγούμενα χρόνια.

Εκτός των παραπάνω πληθυσμών στα πειράματα που διενεργήθηκαν χρησιμοποιήθηκε και ο ευαίσθητος πληθυσμός απο το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο

Αθηνών (ΑΥΑ) και στον οποίο δεν έχει γίνει καμία χρήση σκευασμάτων για τουλάχιστον 15 χρόνια.

Συλλογή πληθυσμών

Τα *Varroa* που χρησιμοποιήθηκαν στις βιοδοκιμές συλλέχθηκαν ύστερα από δειγματοληψία από τα μελισσοκομεία που εξετάστηκαν. Πιο συγκεκριμένα, από κάθε κυψέλη παίρναμε ένα πλαίσιο με σφραγισμένο εργατικό γόνο ή γόνο κηφήνων και το μεταφέραμε σε εργαστηριακό χώρο μελισσοκομίας. Ύστερα με τη βοήθεια μιας λαβίδας ξεσκεπάζαμε τον σφραγισμένο γόνο και σύραμε έξω τις προνύμφες των μελισσών (εικ 13). Εξετάζοντας προσεκτικά τις προνύμφες των μελισσών και το κελί από το οποίο αφαιρέθηκε (εικ 14), συλλέγουμε με τη βοήθεια ενός πινέλου τα *Varroa*. Το πινέλο μας βοηθά ώστε να μεταφέρουμε τα ακάρεα σε ένα τριβλίο χωρίς να τα τραυματίσουμε. Όπως αναφέραμε τα *Varroa* εισέρχονται μέσα στο κελί του γόνου λίγο πριν σφραγιστεί από τις εργάτριες μέλισσες και αρχίζει τη διαδικασία αναπαραγωγής μετά από τρεις ημέρες.

Κύριο μέλημα μας ήταν η συλλογή βαρρόα που μόλις είχαν σφραγιστεί και οι μέλισσες ήταν στο στάδιο της προνύμφης ώστε να εξασφαλίσουμε ότι τα *Varroa* που θα συλλεχθούν είναι κατάλληλης ηλικίας (ενήλικα) και όχι άτομα που προήλθαν από τη σύζευξη και είναι ανώριμα ηλικιακά. Επίσης, δεδομένου ότι τα *Varroa* προτιμούν τον κηφηνογόνο λόγω του μεγαλύτερου διαστήματος που τα κελιά μένουν σφραγισμένα έναντι του εργατικού γόνου, η συλλογή των ακάρεων γινόταν πιο εύκολα όταν υπήρχε παρουσία κηφηνογόνου στα μελίσσια.

Μετά τη συλλογή του επιθυμητού αριθμού ακάρεων ο οποίος καθοριζόταν από το πλήθος των βιοδοκιμών, τα ακάρεα μεταφέρονταν μέσω τριβλίων ώστε να διατηρούνται προστατευμένα, σε εργαστηριακό χώρο όπου θα λάμβαναν χώρα οι βιοδοκιμές.



Εικόνα 13. Κελιά κηφηνογόνου που εξετάζονται για προσβολή απο *Varroa*.



Εικόνα 14. Προνύμφη μέλισσας προσβεβλημένη απο *Varroa*

Κλασικές βιοδοκιμές

Χρησιμοποιήθηκαν δραστικές ουσίες *coumaphos*, *amitraz*, *t-fluvalinate* υψηλής καθαρότητας που προμηθεύτηκαν από την Sigma-aldrich. Δοκιμάστηκαν 4-5 συγκεντρώσεις των δραστικών ουσιών , 4 επαναλήψεις σε κάθε συγκέντρωση και 10 άτομα σε κάθε επανάληψη συγκέντρωσης.

Για τις βιοδοκιμές ακολουθήθηκε η παρακάτω μεθοδολογία. Αρχικά, η διάλυση των δραστικών ουσιών έγινε με τη βοήθεια ακετόνης με σκοπό τη δημιουργία Stock Solution στα 10.000 ppm. Με τη βοήθεια πιπέτας ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις με σκοπό τη δημιουργία των συγκεντρώσεων προς μελέτη. Ύστερα, με τη βοήθεια πιπέτας μεταφέραμε 0,5 mL διαλύματος σε γυάλινα vials. Ακολουθούσε ρολλάρισμα των vials ούτως ώστε να εξατμιστεί πλήρως η ακετόνη και ένα λεπτό στρώμα εντομοκτόνου να επικαθήσει στην εσωτερική επιφάνεια του vial. Σε κάθε βιοδοκιμή υπήρχε η παρουσία μάρτυρα που ήταν ένα vial στο οποίο είχε ακολουθηθεί η ίδια διαδικασία χωρίς τη χρήση εντομοκτόνου αλλά με καθαρή ακετόνη. Αφού εξατμιστεί πλήρως η ακετόνη, τα ακάρεα μεταφέρονταν με τη βοήθεια ενός πινέλου μέσα στο vial. Σε κάθε vial τοποθετούνταν 10 *Varroa* και ύστερα τα vials μεταφέρονταν σε θάλαμο με ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας (25°C) όπου παρέμεναν για 20 ώρες. Μετά το πέρας του χρονικού αυτού διαστήματος γίνονταν εξέταση των *Varroa* ώστε να δούμε πόσα είχαν πεθάνει και να υπολογιστεί το ποσοστό θνησιμότητας στη συγκεκριμένη συγκέντρωση. Κάθε άκαρι εξεταζόταν ξεχωριστά και χαρακτηριζόταν ως νεκρό όταν μετά από απαλό σκούνηγμα με μια λαβίδα δεν υπήρχε κίνηση στα πόδια ικανή να μετακινηθεί το άκαρι τουλάχιστον 5mm.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Υπολογισμός των επιπέδων ανθεκτικότητας

Με την μέθοδο των βιοδοκιμών μπορεί να γίνει η διαπίστωση και η μέτρηση της ανθεκτικότητας ενός πληθυσμού. Μπορεί δηλαδή να προσδιοριστεί ο βαθμός ανθεκτικότητας ενός πληθυσμού υπολογίζοντας την θνησιμότητα του συγκριτικά με την θνησιμότητα ενός ευαίσθητου πληθυσμού αναφοράς. Στις βιοδομικές χρησιμοποιούνται άτομα ίδιας ηλικίας. Ως μέτρο σύγκρισης της τοξικότητας χρησιμοποιείται η τιμή LC50 που ορίζεται ως η συγκέντρωση της τοξικής ουσίας που θανατώνει το 50% ενός πληθυσμού.

Ανθεκτικότητα στο *Coumarphos*

Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών με το *coumarphos* στον ευαίσθητο πληθυσμό αναφοράς AUA αναλύθηκαν με βάση τη θνησιμότητα και ορίστηκε διαγνωστική συγκέντρωση 100μg/vial με σκοπό τον έλεγχο ανθεκτικότητας. Σε αυτή τη συγκέντρωση τα *Varroa* του AUA παρουσίασαν θνησιμότητα 80-90% ενώ στην ίδια συγκέντρωση εκτέθηκαν ακάρεα από τους πληθυσμούς *Andros*, *Naxos#A*, *Naxos#B* και παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στη θνησιμότητα σε σύγκριση με τον ευαίσθητο πληθυσμό.

Ο πληθυσμός *Andros* παρουσίασε θνησιμότητα μόνο 2% όταν εκτέθηκε στην διαγνωστική συγκέντρωση που αναμενόταν θνησιμότητα της τάξης 80-90% για ένα ευαίσθητο άκαρι. Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών χαρακτηρίζουν τον πληθυσμό αυτόν ως πάρα πολύ ανθεκτικό, για αυτό το λόγο εξετάστηκε και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ακόμα και 100 φορές μεγαλύτερη της διαγνωστικής συγκέντρωσης (10.000 ppm/vial). Ακόμα και στη μέγιστη αυτή συγκέντρωση η θνησιμότητα δεν ξεπερνούσε το ποσοστό του 10%. Το LC50 του πληθυσμού, δηλαδή η συγκέντρωση η οποία θανατώνει το 50% του εξεταζόμενου πληθυσμού ξεπερνά τα 10.000ppm ενώ η συχνότητα ανθεκτικότητας (*Resistance ratio – RR*) ξεπερνά το 662,87. (Πίνακας 2). Ο πληθυσμός *Andros* χαρακτηρίζεται ως πάρα πολύ ανθεκτικός ενώ είναι η πρώτη φορά που καταγράφεται τέτοιο ποσοστό ανθεκτικότητας στην Ελλάδα.

Ο πληθυσμός *Naxos#A* παρουσίασε θνησιμότητα μόνο 23,33% όταν εκτέθηκε στην διαγνωστική συγκέντρωση. Επειδή και αυτός ο πληθυσμός

χαρακτηρίζεται ως ανθεκτικός εξετάστηκε σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, 5 φορές (500 $\mu\text{g}/\text{vial}$) και 20 φορές (2000 $\mu\text{g}/\text{vial}$) μεγαλύτερες της διαγνωστικής συγκέντρωσης. Και στις δύο περιπτώσεις το ποσοστό θνησιμότητας ήταν 70%. Το LC50 του πληθυσμού ισούται με 454,19 $\mu\text{g}/\text{vial}$ ενώ η συχνότητα ανθεκτικότητας (*Resistance ratio – RR*) είναι ίση με 30 (Πίνακας 2). Λόγω του περιορισμένου αριθμού *Varroa* δεν μπόρεσε να γίνει ο επιθυμητός αριθμός επαναλήψεων, παρόλα αυτά μπορεί να χαρακτηριστεί ο πληθυσμός *Naxos#A* σαν ανθεκτικός στο *coumaphos*.

Παρομοίως ο πληθυσμός *Naxos#B* παρουσίασε θνησιμότητα 25% μετά από έκθεση στη διαγνωστική συγκέντρωση. Όπως και ο πληθυσμός *Naxos#A* έτσι και αυτός εκτέθηκε σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις 5 φορές (500 $\mu\text{g}/\text{vial}$) και 20 φορές (2000 $\mu\text{g}/\text{vial}$) μεγαλύτερες της διαγνωστικής συγκέντρωσης. Στη πρώτη περίπτωση (500 $\mu\text{g}/\text{vial}$) η θνησιμότητα ήταν ίση με 30% ενώ στη δεύτερη περίπτωση (2000 $\mu\text{g}/\text{vial}$) η θνησιμότητα έφτασε το 40%. Το LC50 του πληθυσμού ισούται με 1146,67 $\mu\text{g}/\text{vial}$ ενώ η συχνότητα ανθεκτικότητας (*Resistance ratio – RR*) είναι ίση με 76 (Πίνακας 2). Όπως και στη προηγούμενη περίπτωση (*Naxos#A*) δεν μπόρεσε να γίνει ο επιθυμητός αριθμός επαναλήψεων λόγω του περιορισμένου αριθμού *Varroa*, παρόλα αυτά και αυτός ο πληθυσμός μπορεί να χαρακτηριστεί ανθεκτικός στο *coumaphos*.

Στον Πίνακα 1. παρουσιάζονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα ανάλυσης της θνησιμότητας των προς εξέταση πληθυσμών, στη διαγνωστική δόση *coumaphos* (100 $\mu\text{g}/\text{vial}$) όπως αυτή καθορίστηκε ύστερα από σειρά βιοδοκιμών στον ευαίσθητο πληθυσμό *AUA*.

Στον Πίνακα 2. παρουσιάζονται οι θανατηφόρες συγκεντρώσεις που σκοτώνουν διάφορα ποσοστά των εξεταζόμενων πληθυσμών (LC10,LC50,LC90) ύστερα από ανάλυση των αποτελεσμάτων των βιοδοκιμών καθώς και η συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικότητας (*Resistance Ratio-RR*) σε κάθε πληθυσμό η οποία ισούται με το πηλίκο της διαίρεσης της θανατηφόρας συγκέντρωσης που σκοτώνει το 50% ενός ανθεκτικού πληθυσμού (LC50) προς τη θανατηφόρα συγκέντρωση που σκοτώνει το 50% του ευαίσθητου πληθυσμού.

Πληθυσμός	Ποσοστό θνησιμότητας % (100μg <i>coumaphos</i> /vial)
AUA (Ευαίσθητος)	80%
ANDROS	2%
NAXOS#A	23,33%
NAXOS#B	25%

Πίνακας 1. Μέσοι όροι ποσοστών θνησιμότητας πληθυσμών στη διαγνωστική συγκέντρωση *coumaphos* (100μg/vial)

Πληθυσμός	LC10	LC50	LC90	RR
AUA	2,63	15,09	83,18	-
Andros	3981,07	>10.000	>10.000	>662,07
Naxos #A	91,20	454,19	2290,87	30
Naxos #B	173,78	1146,67	7413,10	76

Πίνακας 2. Θανατηφόρες συγκεντρώσεις *coumaphos* ανά πληθυσμό και συχνότητα έμφανισης ανθεκτικότητας (RR)

*μg *coumaphos*/vial

Ανθεκτικότητα στο τ-Fluvalinate & Amitraz

Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών με το *τ-fluvalinate* στον ευαίσθητο πληθυσμό αναφοράς AUA αναλύθηκαν με βάση τη θνησιμότητα και ορίστηκε διαγνωστική συγκέντρωση 5μg/vial με σκοπό τον έλεγχο ανθεκτικότητας στους ύποπτους πληθυσμούς. Σε αυτή τη συγκέντρωση τα *Varroa* του AUA παρουσίασαν θνησιμότητα 90-100% ενώ στην ίδια συγκέντρωση εκτέθηκαν ακάρεα από τους πληθυσμούς *Andros*, *Naxos#A*, *Naxos#B* και παρουσίασαν ίδια ποσοστά θνησιμότητας (Πίνακας 3).

Πληθυσμός	Ποσοστό θνησιμότητας % (5μg τ-fluvalinate/vial)
AUA (Ευαίσθητος)	95%
ANDROS	100%
NAXOS#A	90%
NAXOS#B	90%

Πίνακας 3. Μέσοι όροι ποσοστών θνησιμότητας πληθυσμών στη διαγνωστική συγκέντρωση τ-fluvalinate (5μg/vial)

Όσον αφορά τα *amitraz* μετά απο εκτέλεση βιοδοκιμών στον ευαίσθητο πληθυσμό AUA και ανάλυση των αποτελεσμάτων με βάση τη θνησιμότητα, η διαγνωστική συγκέντρωση ορίστηκε 1μg/vial με σκοπό τον έλεγχο ανθεκτικότητας στους ύποπτους πληθυσμούς. Σε αυτή τη συγκέντρωση τα *Varroa* του AUA παρουσίασαν θνησιμότητα 100% ενώ στην ίδια συγκέντρωση εκτέθηκαν ακάρεα απο τους πληθυσμούς *Andros*, *Naxos#A*, *Naxos#B* και παρουσίασαν ίδια ποσοστά θνησιμότητας (Πίνακας 4).

Πληθυσμός	Ποσοστό θνησιμότητας % (1μg amitraz/vial)
AUA (Ευαίσθητος)	100%
ANDROS	100%
NAXOS#A	100%
NAXOS#B	100%

Πίνακας 4. Μέσοι όροι ποσοστών θνησιμότητας πληθυσμών στη διαγνωστική συγκέντρωση *amitraz* (1μg/vial)

Ο πληθυσμός *Andros* παρουσίασε 100% θνησιμότητα στις διαγνωστικές δόσεις τόσο του *τ-fluvalinate* (5μg/vial) όσο και του *amitraz* (1μg/vial) η οποία ήταν στα ίδια ποσοστά με τον ευαίσθητο πληθυσμό *AUA*. Παρότι οι επαναλήψεις που έγιναν δεν ήταν οι επιθυμητές λόγω περιορισμένου αριθμού *Varroa* μπορούμε να χαρακτηρίσουμε τον πληθυσμό αυτό ως μη ανθεκτικό στις δραστικές ουσίες *τ-fluvalinate* και *amitraz*.

Οι πληθυσμοί *Naxos#A* , *Naxos#B* έδωσαν ίδια αποτελέσματα όταν εξετάστηκαν στις διαγνωστικές δόσεις του *τ-fluvalinate* και του *amitraz* ,όπως αυτές καθορίστηκαν ύστερα απο την ανάλυση των βιοδοκιμών στον ευαίσθητο πληθυσμό *AUA*.

Στις βιοδοκιμές που οι πληθυσμοί εκτέθηκαν στην διαγνωστική δόση *τ-fluvalinate* (5mg/vial) παρουσίασαν ποσοστό θνησιμότητας 90%, ενώ ο ευαίσθητος πληθυσμός *AUA* παρουσιάζει θνησιμότητα 95%. Η απόκλιση ευαίσθητος – υπόπτων για ανάπτυξη ανθεκτικότητας πληθυσμών φαίνεται να είναι μικρή και απαιτούνται μελλοντικές επαναλήψεις βιοδοκιμών για την εξαγωγή σαφέστερων συμπερασμάτων. Παρόλα αυτά οι μέχρι τώρα ενδείξεις μας δείχνουν οτι οι πληθυσμοί δεν είναι σημαντικά ανθεκτικοί στο *τ-fluvalinate*.

Στις βιοδοκιμές που οι πληθυσμοί εκτέθηκαν στην διαγνωστική δόση *amitraz* (1mg/vial) παρουσίασαν ποσοστό θνησιμότητας 100%, ενώ ο ευαίσθητος πληθυσμός *AUA* παρουσιάζει θνησιμότητα 100%. Η μη διαφοροποίηση μεταξύ των αποτελεσμάτων μας οδηγούν στο συμπέρασμα πως ούτε αυτοί οι πληθυσμοί παρουσιάζονται ανθεκτικοί στο *amitraz*.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αναλύοντας τα αποτελέσματα των κλασσικών βιοδοκιμών με το *coumaphos* παρατηρήθηκε ότι ο πληθυσμός *Andros* εμφάνισε τα υψηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας με RR στο LC50 >662,07. Και οι πληθυσμοί *Naxos#A*, *Naxos#B* εμφάνισαν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας σε σχέση με τον ευαίσθητο αναφοράς *AUA* με LC50 30 και 76 αντίστοιχα.

Μετά την ανάλυση των αποτελεσμάτων των κλασσικών βιοδοκιμών με το *τ-fluvalinate* και το *amitraz* παρατηρήθηκε πως κανένας πληθυσμός δεν εμφανίζει επίπεδα ανθεκτικότητας στις δυο αυτές δραστικές.

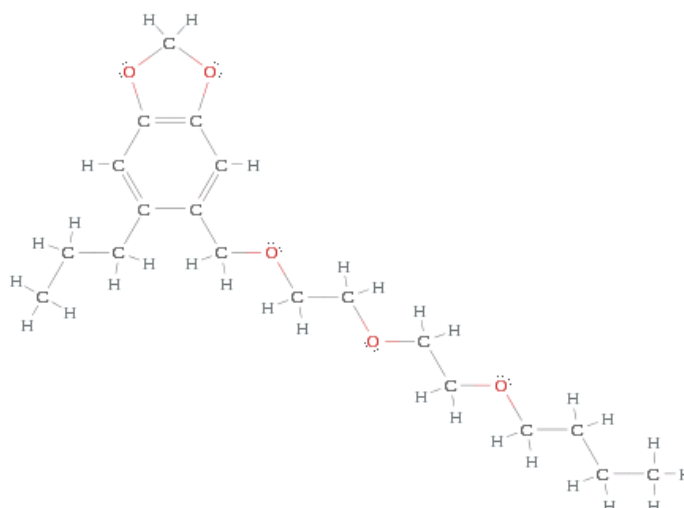
Η συνεχιζόμενη χρήση ταινιών *CheckMite+* με δραστική ουσία το *Coumaphos* επι τουλάχιστον 12 χρόνια στον πληθυσμό *Andros* συνετέλεσε στην ανάπτυξη πολύ υψηλών ποσοστών ανθεκτικότητας. Ενώ και οι πληθυσμοί *Naxos#A*, *Naxos#B* παρουσίασαν υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας παρόλο που οι μελισσοκόμοι δήλωσαν ότι έκαναν εναλλαγές στη χρήση φαρμάκων κυρίως με *amitraz*.

Το γεγονός ότι κανένας πληθυσμός δεν εμφανίζει επίπεδα ανθεκτικότητας στο *amitraz* και στο *τ-fluvalinate* μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν εμφανίζεται διασταυρωτή ανθεκτικότητα μεταξύ των ακαρεοκτόνων.

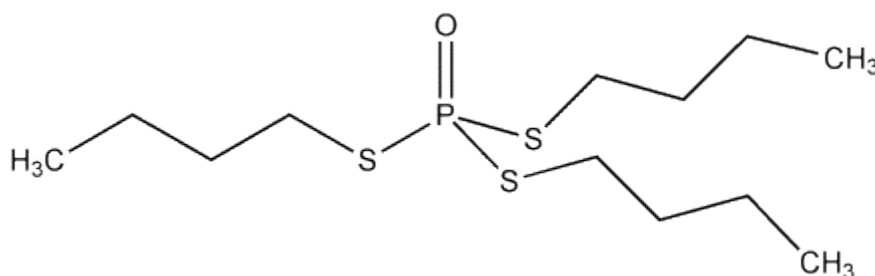
Προκειμένου να γίνει καλύτερα αντιληπτό ποιοί είναι οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας στους εν λόγω ανθεκτικούς πληθυσμούς ακολούθησαν βιοδοκιμές με τη χρήση συνεργιστών καθώς και βιοχημικές αναλύσεις για το προσδιορισμό ενεργότητας ενζύμων αποτοξικοποίησης.

Βιοδοκιμές με συνεργιστές

Οι συνεργιστές είναι σχετικά μη τοξικές εκλεκτικές ουσίες οι οποίες συνδυαζόμενες με δραστικές ουσίες μπορούν να προκαλέσουν αύξηση της βιοκτόνου δράσης, παρεμποδίζοντας ενζυμικά συστήματα στις περιπτώσεις πληθυσμών εντόμων που αυτά συμμετέχουν. Για την διερεύνηση της πιθανής συμμετοχής των ενζυμικών συστημάτων στην ανθεκτικότητα χρησιμοποιήθηκαν οι συνεργιστικές ουσίες S,S,S-trybutyl phosphorotrithioate (DEF) (Εικ.16) και piperonyl butoxide (PBO) (Εικ.15). Το DEF δρα παρεμποδίζοντας τις εστεράσες και τις τρανσφεράσες της γλουταθειόνης ενώ το PBO δρα ως παρεμποδιστής των μικτής λειτουργίας P450s οξειδασών και των εστερασών.



Εικόνα 15 : Συντακτικός τύπος piperonyl butoxide (PBO)



Εικόνα 16. Συντακτικός τύπος S,S,S-trybutyl phosphorotrithioate (DEF)

Η εύρεση των διαγνωστικών συγκεντρώσεων *coumaphos* έγινε μετά από προκαταρκτικά πειράματα βιοδοκιμών του ευαίσθητου πληθυσμού αναφοράς *AUA*. Προσδιορίστηκε η μέγιστη συγκέντρωση που δεν προκαλεί θνησιμότητα αλλά παρεμποδίζει τα ενζυμικά συστήματα. Η μεθοδολογία των βιοδοκιμών με συνεργιστές είναι η ίδια με αυτή των βιοδοκιμών με ακαρεοκτόνα. Η εφαρμογή των συνεργιστικών ουσιών γίνεται με εσωτερική επικάλυψη στο vial, στον μάρτυρα αντί συνεργιστού εφαρμόζεται καθαρή ακετόνη. Η εφαρμογή των συνεργιστών πραγματοποιήθηκε 2 ώρες πριν την έκθεση των ακάρεων στο *coumaphos*. Μετά από 20 ώρες πραγματοποιείται η μέτρηση θνησιμότητας. Κατάλληλη συγκέντρωση συνεργιστικών ουσιών ήταν 100μg/vial για το DEF και για το PBO.

Επίδραση των συνεργιστών στην ανθεκτικότητα

Μελετήθηκε η επίδραση των συνεργιστών PBO και DEF στην θνησιμότητα των ακάρεων από *coumaphos* στον ευαίσθητο πληθυσμό *AUA*. Τα δεδομένα από τις βιοδοκιμές έκθεσης των *Varroa* σε PBO για δύο ώρες και ύστερα έκθεση αυτών σε *coumaphos* για 24 ώρες μας δείχνει πόσο σημαντικό ρόλο παίζουν οι συνεργιστές στην δράση των εντομοκτόνων. Πιο συγκεκριμένα το PBO ενίσχυσε την ακαρεοκτόνο δράση του *Coumaphos* και ακάρεα τα οποία εκτέθηκαν σε PBO και *coumaphos* παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας σε σύγκριση με τα ακάρεα που εκτέθηκαν μόνο σε *coumaphos* (Πίνακας 5). Τα ακάρεα τα οποία εκτέθηκαν μόνο σε *coumaphos* παρουσίασαν $LC_{50}=15,09\mu g/vial$ ενώ ακάρεα τα οποία εκτέθηκαν πρώτα σε PBO και ύστερα σε *coumaphos* έχουν $LC_{50}=1,38\mu g/vial$. Οι βιοδοκιμές με τον συνεργιστή PBO και *coumaphos* στα ακάρεα του ευαίσθητου πληθυσμού *AUA* επαναλήφθηκαν δυο φορές ενώ τα σχέδια μας περιλαμβάνουν παρόμοιες δοκιμές με τον συνεργιστή DEF και *coumaphos*.

Με τον ίδιο τρόπο έγιναν βιοδοκιμές με χρήση συνεργιστών (PBO & DEF) στον πολύ ανθεκτικό στην δραστική ουσία *coumaphos* πληθυσμό *Andros*. Τα αποτελέσματα που μας έδωσε ήταν εντυπωσιακά καθώς ενώ στη διαγνωστική μας δόση 100μg/vial δεν είχαμε καθόλου θνησιμότητα, μετά την έκθεση των ακάρεων σε DEF το ποσοστό θνησιμότητας έφτασε το 100% ενώ μετά την

έκθεση των ακάρεων σε PBO το ποσοστό θνησιμότητας έφτασε το 70% (Πίνακας 6).

Πληθυσμός	0,1μg/vial	1μg/vial	10μg/vial	100μg/vial
AUA (<i>coumaphos</i>)	0,00%	35,00%	57,50%	80,00%
AUA (<i>coumaphos</i> + <i>PBO</i>)	5,00%	70,00%	80,00%	93,33%

Πίνακας 5. Σύγκριση Μ.Ο θνησιμότητας *Varroa* ευαίσθητου πληθυσμού (AUA) μετά τη χρήση συνεργιστή (PBO)

Πληθυσμός	Διαγνωστική συγκέντρωση (100μg/vial)
Andros (<i>coumaphos</i>)	0%
Andros (<i>coumaphos</i> + <i>DEF</i>)	100%
Andros (<i>coumaphos</i> + <i>PBO</i>)	70%

Πίνακας 6. Σύγκριση Μ.Ο θνησιμότητας *Varroa* πληθυσμού (*Andros*) μετά τη χρήση συνεργιστών (PBO , DEF)

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αναλύοντας τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών μετά τη χρήση συνεργιστή (PBO) παρατηρήσαμε αύξηση της θνησιμότητας στον ευαίσθητο πληθυσμό (AUA) η οποία γίνεται ακόμα πιο εντυπωσιακή μετά την ανάλυση των αποτελεσμάτων των βιοδοκιμών με χρήση συνεργιστών (DEF,PBO) στον πολύ ανθεκτικό πληθυσμό *Andros*. Στην περίπτωση του πληθυσμού *Andros* παρατηρούμε μεγάλη αύξηση της θνησιμότητας στην διαγνωστική συγκέντρωση (100μg/vial) μετά τη χρήση συνεργιστών, η οποία φτάνει το 100% στη περίπτωση του συνεργιστή DEF. Δεδομένου των παραπάνω αποτελεσμάτων και ότι δεν παρατηρήθηκε φαινόμενο διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ των ακαρεοκτόνων έχουμε κάποιες ενδείξεις ότι η ανθεκτικότητα δεν οφείλεται σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας στόχου αλλά σε δράση ενζύμων αποτοξικοποίησης των ακαρεοκτόνων. Στην ενότητα που ακολουθεί περιγράφονται βιοχημικά διαγνωστικά για τον προσδιορισμό της ενεργότητας των ενζύμων αποτοξικοποίησης των εντομοκτόνων.

B. Προσδιορισμός ενεργότητας ενζύμων αποτοξικοποίησης - εν δυνάμει βιοχημικής ανθεκτικότητας στο coumaphos

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Λόγω του μικρού μεγέθους είναι δύσκολο να μελετηθούν οι βιοχημικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα ακάρεα. Για να μελετηθούν τα ένζυμα που εμπλέκονται στην βιοχημική ανθεκτικότητα μορφοποιήθηκαν και τροποποιήθηκαν μέθοδοι και τεχνικές που χρησιμοποιούνται σε άλλα αρθρόποδα.

Όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενο κεφάλαιο η βιοχημική ανθεκτικότητα συνίσταται από ένζυμα που μεταβολίζουν τα εντομοκτόνα και ακαρεοκτόνα προτού αυτά φτάσουν στους στόχους τους. Βασικά ένζυμα της βιοχημικής ανθεκτικότητας είναι οι εστεράσες, οι μικτής λειτουργίας P450 οξειδάσες και οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ενζυμικά υποστρώματα και υλικά

Για την διενέργεια των βιοχημικών πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα ενζυμικά υποστρώματα: 7-Ethoxy-4-trifluoromethylcoumarin, p-Nitrophenyl acetate, α και β naphthyl acetate, 1-naphthyl 2,2-dimethylbutyrate, 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene και Monochlorobimane. Οι ενεργότητες των ενζύμων αποτοξικοποίησης και της ακετυλοχολινεστεράσης προσδιορίστηκαν με φασματοφωτόμετρο Tecan Spectrafluor microplate reader (Molecular Devices). Όλα τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από την Sigma (Steinheim, Germany)

Πληθυσμοί *V.destructor*

Οι ενεργοποιητές των ενζυμικών συστημάτων μετρήθηκαν στους πληθυσμούς *AUA* (ευαίσθητος), *Andros* (ανθεκτικός στο *coumaphos*).

Προετοιμασία δειγμάτων

Για την μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της ακετυλοχολινεστεράσης 5 ακμαία θηλυκά άτομα ομογενοποιήθηκαν σε 0,2 ml 0,1M sodium phosphate buffer, pH: 7,2 με ομογενοποιητή που εφαρμόζει σε 1,5 ml eppendorf tube. Έγινε μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης σύμφωνα με μέθοδο Bradford στα 595nm end point και στην συνέχεια προστέθηκε το απορρυπαντικό Triton σε συγκέντρωση 1% στο δείγμα.

Για την ενεργότητα των εστερασών και των μεταφορέων της γλουταθειόνης (GSTs) ένα ακμαίο *Varroa* ομογενοποιήθηκε σε 0,04ml 0,1M sodium phosphate buffer, pH: 7,2 και φυγοκεντρήθηκε στις 5.000 rpm (στροφές ανά λεπτό) για 5 λεπτά στους 4 °C για την κατακρήμνιση των αδιάσπαστων τμημάτων του ακάρεως και έγινε συλλογή του υπερκείμενου διαλύματος. Έγινε μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης σύμφωνα με μέθοδο Bradford στα 595nm end point.

Για την ενεργότητα των μονοοξυγενασών 10 ακμαίων *Varroa* ομογενοποιήθηκαν σε 0,1 ml 0,1M sodium phosphate buffer, PH: 7,2 και φυγοκεντρήθηκε στις 5.000 rpm (στροφές ανά λεπτό) για 5 λεπτά στους 4 °C και έγινε συλλογή του υπερκείμενου διαλύματος. Έγινε μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης σύμφωνα με μέθοδο Bradford στα 595nm end point.

Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεΐνης

Η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης γίνεται με την χρήση της πρωτεΐνης BSA (bovine serum albumin) σε διαδοχικές ποσότητες σε μικροπλάκα (96-well plate). Χρησιμοποιήθηκαν 10μl από το ομογενοποίημα κάθε αγνώστου δείγματος. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης μετρήθηκε σύμφωνα με το αντιδραστήριο Bradford στα 595nm end point.

Μέτρηση ενεργότητας ενζυμικών συστημάτων

Ακετυλοχολινεστεράση

Για τον υπολογισμό της ενεργότητας της ακετυλοχολινεστεράσης χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω ενζυμικά υποστρώματα: α) 5',5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) 0.5mM β) acetylthiocholine (AcSCh) 1.25mM

Για τις δοκιμές παρεμπόδισης, η υπολειπόμενη ενεργότητα ακετυλοχολινεστεράσης μετρήθηκε παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων (OP) malaoxon και coumaphos oxon (10^{-8}M - 10^{-4}M). Συγκεκριμένα έγινε επώαση του ενζύμου με τον παρεμποδιστή για 10 λεπτά και στη συνέχεια προστέθηκαν τα ενζυμικά υποστρώματα. Η ενεργότητα μετρήθηκε στο φωτόμετρο στα 405nm για 10 λεπτά κινητικά.

Το IC₅₀ δηλαδή η συγκέντρωση αναστολέα που παρεμποδίζει το 50% του ενζύμου (IC₅₀) προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ανάλυσης δεδομένων 3,0 Grafit.

Μεταφοράσες ή τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs)

Για τον υπολογισμό της ενεργότητας των GSTs χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω ενζυμικά υποστρώματα: α) CDNB (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene) β) GSH

Η αντίδραση αποτελούταν από 10-20μg πρωτεΐνης ομογενοποιηήματος, 9.9μl 10mM GSH, 9.9μl 3mM CDNB και 0.1M Sodium Phosphate Buffer (SPB) pH:6.5. Στον μάρτυρα αντί ομογενοποιηήματος χρησιμοποιήθηκε 0.1M SPB pH:6.5. Οι διαφορές στην απορρόφηση μετρήθηκαν κινητικά στα 340nm σε φωτόμετρο. Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε $\mu\text{mol mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Monochlorobimane (MCB)

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 200μl, αποτελούμενος από 15-30μg πρωτεΐνης ομογενοποιηήματος, 0.003 mM MCB, 3mM GSH και Tris/HCl pH:7.5 buffer. Στον μάρτυρα αντί ομογενοποιηήματος χρησιμοποιήθηκε 0.1M SPB

PH:6.5. Η μικροπλάκα επωάστηκε στους 22°C για 20 λεπτά και ο φθορισμός υπολογίστηκε στο φωτόμετρο με excitation στα 380nm και emission στα 465nm σε endpoint assay. Η ενεργότητα των GSTs εκφράζεται ως μονάδες φθορισμού ανά μικρογραμμάρια πρωτεΐνης.

Εστεράσες

Για τον υπολογισμό της ενεργότητας των εστερασών χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω ενζυμικά υποστρώματα:

α) 4-NPA (4-nitrophenyl acetate)

Ο υπολογισμός ενεργότητας εστερασών με 4-NPA έγινε σύμφωνα με Van Leeuwen et al 2005 με ορισμένες τροποποιήσεις. Το διάλυμα της αντίδρασης περιελάμβανε 10 και 20 μg πρωτεΐνης και 200 μl working solution (1mM p-nitrophenyl acetate σε sodium phosphate buffer (0.1M pH 7.5)). Η ενεργότητα των εστερασών μετρήθηκε στο φωτόμετρο στα 405nm για 10 λεπτά κινητικά και εκφράζεται σε $\text{nmole mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

β) 1- and 2- naphthyl acetate

Σε 2-5 μg πρωτεΐνης έγινε προσθήκη υποστρωμάτων 0.3mM 1- and 2-naphthyl acetate (NA) και επωάστηκε για 30 λεπτά. Μετά την επώαση, 50 μl διαλύματος Fast Blue (6.4 mM Fast Blue (Sigma Aldrich) διαλύθηκαν σε 35 mM sodium phosphate buffer pH 7 που περιέχει 35 g L^{-1} SDS) προστέθηκαν για άλλα 5 λεπτά. Η ενεργότητα των εστερασών μετρήθηκε στα 570nm και εκφράστηκε ως $\text{nmol 1- ή 2- naphthol mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

P450s οξειδάσες

Η μέτρηση της ενεργότητας των P450s οξειδασών έγινε με το ενζυμικό υπόστρωμα 7-Ethoxycoumarin (7-EC) και NADPH σε συγκεντρώσεις 1mM και 1,25mM αντίστοιχα. Σε 50-100 μg πρωτεΐνης από το ομογενοποίημα έγινε προσθήκη 0,1M SPB PH:7,2, 1,25mM NADPH, 1mM 7-EC) σε πηγαδάκια της

μικροπλάκας. Στον μάρτυρα αντί ομογενοποιήματος χρησιμοποιήθηκε 0,1 M SPB PH:7,2 και αντί του υποστρώματος 7-EC το DMSO. Η μικροπλάκα παρέμεινε για επώαση για 30 λεπτά, σε συνθήκες σκότους (καλυμμένη με φύλλο αλουμινίου). Μετά από επώαση 10 λεπτά στους 25 °C η αντίδραση σταμάτησε με προσθήκη διαλύματος 50% ακετονιτρίλιο σε Trizma base buffer (50mM, pH 7,5). Η ποσότητα της 7 hydroxycoumarin που ελευθερώνεται κατά την επώαση υπολογίζεται στο φωτόμετρο στα 465nm με excitation στα 390nm. Η ειδική ενεργότητα των P450 καθορίστηκε χρησιμοποιώντας μια πρότυπη καμπύλη 7-OH coumarin και εκφράστηκε σε pmole7OH/min/mg protein.

Αποτελέσματα

Strain	CDNB ($\mu\text{mol/min/mg}$)	MCB (RFU/ μg)	4NPA (nmole /min/mg)	1-NA nmole /min/mg	2-NA nmole /min/mg	7-EC pmole 7OH/min/mg
AUA	0.013 $\pm$ 0.002	537.18 $\pm$ 54.9	16.43 $\pm$ 1.9	17,66 $\pm$ 1,15	24,31 $\pm$ 1,66	8,53 $\pm$ 3,3
Andros	0.019 $\pm$ 0.002	*74.14 $\pm$ 8,32	15.84 $\pm$ 1.7	18,81 $\pm$ 0,57	23,55 $\pm$ 1,52	10,46 $\pm$ 4,75

*στατιστικά σημαντική διαφορά

Πίνακας 7 . Ενεργότητα ενζύμων αποτοξικοποίησης στους πληθυσμούς AUA και Andros

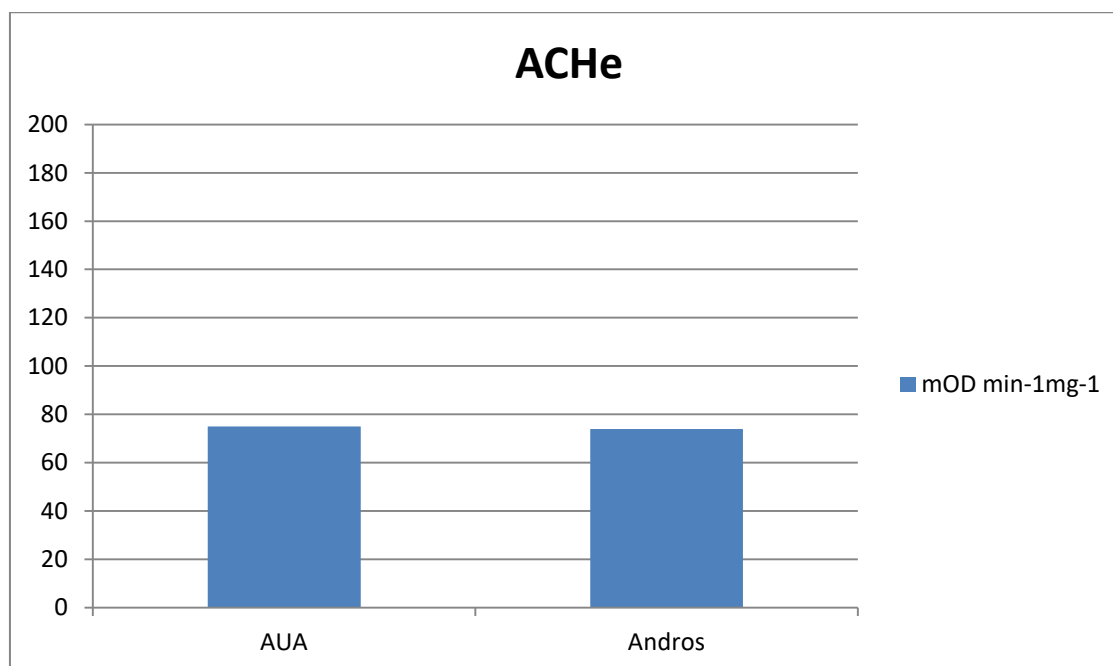
Strain	AChE activity (mOD min ⁻¹ mg ⁻¹)	Malaoxon IC ₅₀	Cumafos oxon IC ₅₀
AUA	75,01 $\pm$ 5,35	2,37x 10 ⁻⁵	6,90x 10 ⁻⁷
Andros	73,89 $\pm$ 4,72	3,23x 10 ⁻⁵	8,08x 10 ⁻⁷

Πίνακας 8 . Ενεργότητα ακετυλοχολινεστεράσης και IC₅₀ στο Malaoxon και Coumaphos oxon

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ενεργότητα ακετυλοχολινεστεράσης

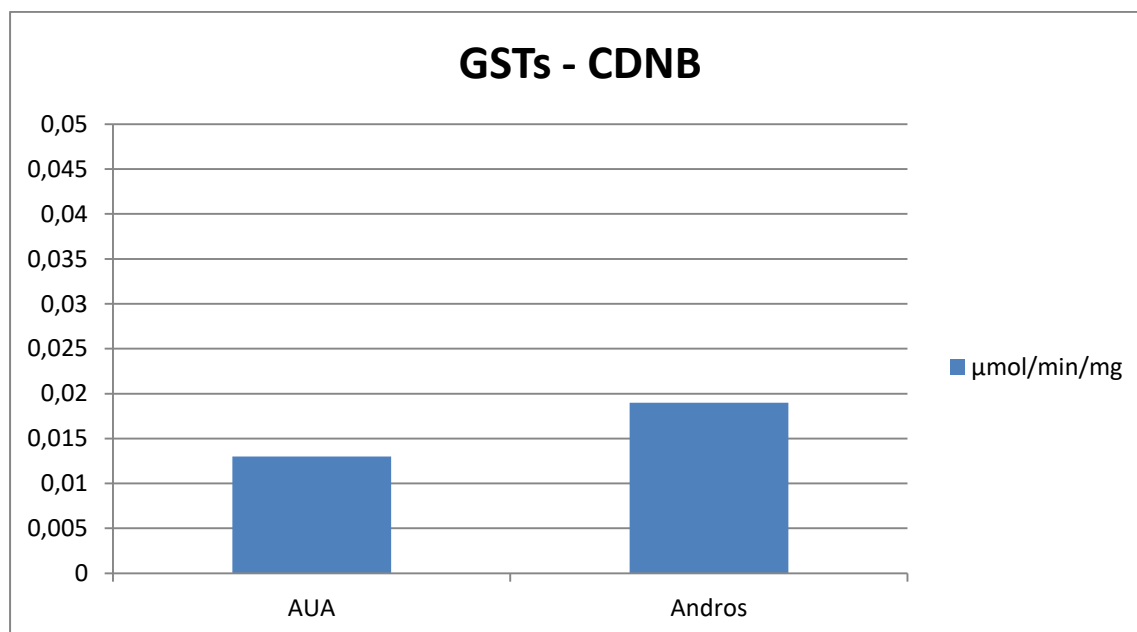
Οι πληθυσμοί δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ενεργότητα του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης. Πιο συγκεκριμένα η ενεργότητα της ακετυλοχολινεστεράσης στα ενζυμικά υποστρώματα DTNB και AcSCh εμφάνισε κοντινές τιμές μεταξύ του ανθεκτικού στο *coumaphos* πληθυσμό *Andros* και του ευαίσθητου *AUA* (Διάγραμμα 1). Το IC₅₀ δηλαδή η συγκέντρωση των αναστολέων (*Malaoxon* και *coumaphos oxon*) που παρεμποδίζει το 50% της ενεργότητας της ακετυλοχολινεστεράσης εμφανίστηκε ελαφρώς αυξημένο του ευαίσθητου χωρίς όμως στατιστικά σημαντικές διαφορές.



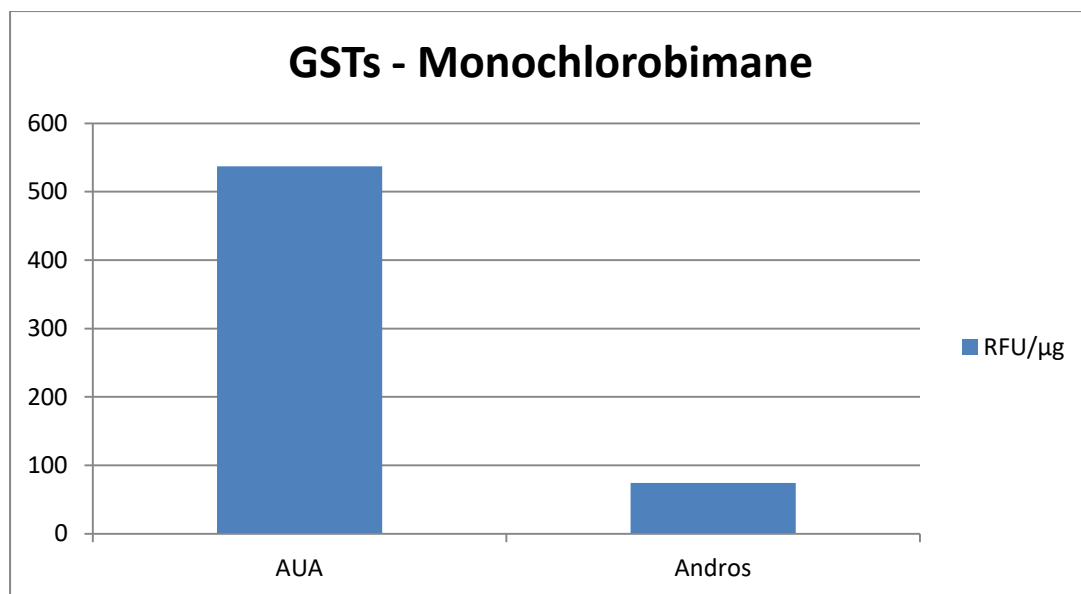
Διάγραμμα 1: Ενεργότητα ακετυλοχολινεστεράσης (AChE)

Ενεργότητα μεταφορασών της γλουταθειόνης

Μετά την εξέταση της ενεργότητας των μεταφορασών της γλουταθειόνης (GSTs) στους εξεταζόμενους πληθυσμούς παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές της ενεργότητας στο ένα υπόστρωμα. Πιο συγκεκριμένα, ενώ στο υπόστρωμα CDNB δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές της ενεργότητας των GSTs μεταξύ του ανθεκτικού πληθυσμού *Andros* και του ευαίσθητου (Διάγραμμα 2), μετά την εξέταση της ενεργότητας των GSTs στο υπόστρωμα Monochlorobimane (MCB) προκύπτουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δυο πληθυσμών με αποτέλεσμα η ενεργότητα στον ευαίσθητο πληθυσμό *AUA* να είναι σημαντικά αυξημένη έναντι του ανθεκτικού πληθυσμού *Andros* (Διάγραμμα 3).



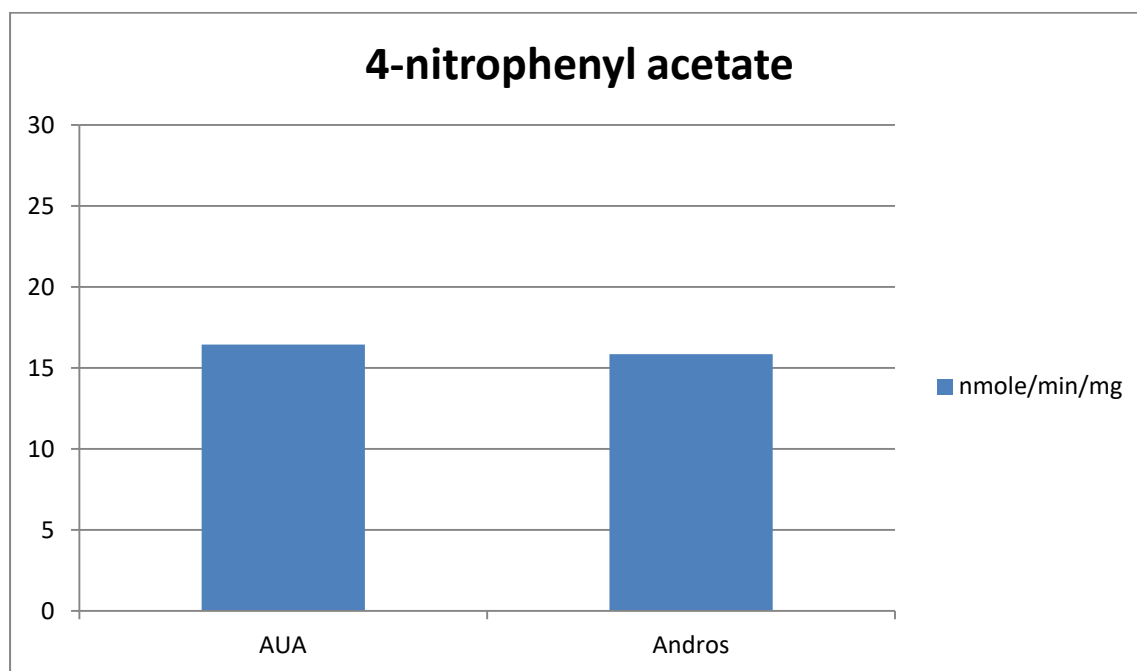
Διάγραμμα 2: Ενεργότητα GSTs με CDNB



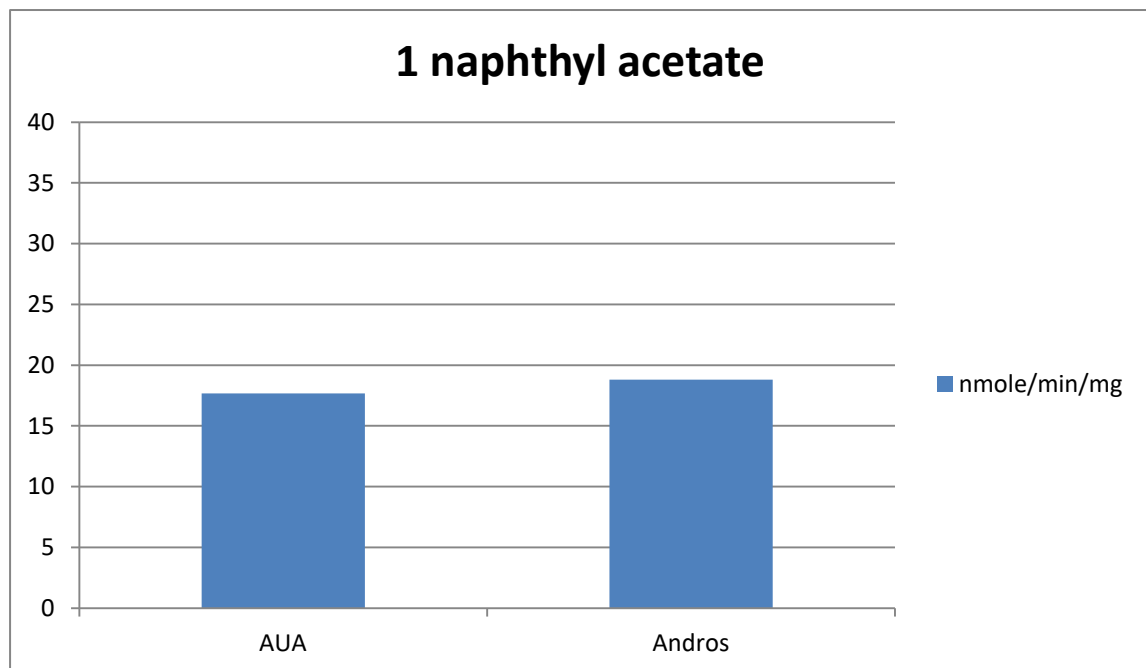
Διάγραμμα 3: Ενεργότητα GSTs με Monochlorobimane

Ενεργότητα εστερασών

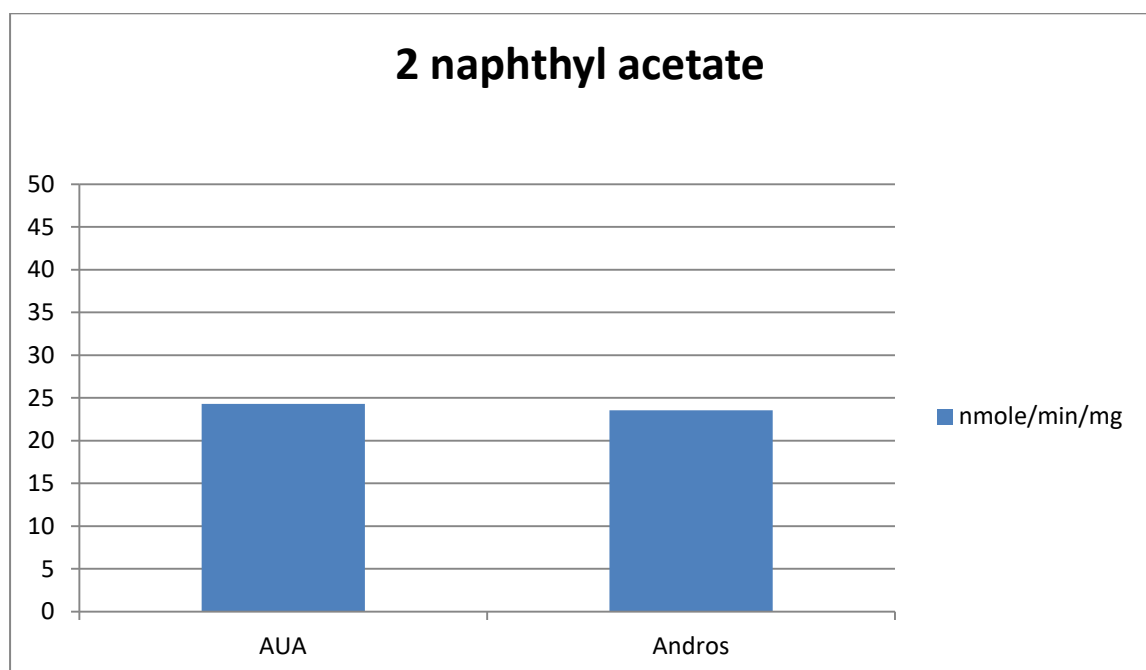
Όλοι οι υπό μελέτη πληθυσμοί δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ενεργότητα των εστερασών. Πιο συγκεκριμένα, τόσο στο υπόστρωμα 4-NPA (Διάγραμμα 4) όσο και στα υποστρώματα 1- and 2- naphthyl acetate δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των εστερασών του ανθεκτικού πληθυσμού *Andros* και του ευαίσθητου *AUA* (Διάγραμμα 5,6).



Διάγραμμα 4: Ενεργότητα εστερασών με 4-nitrophenyl acetate



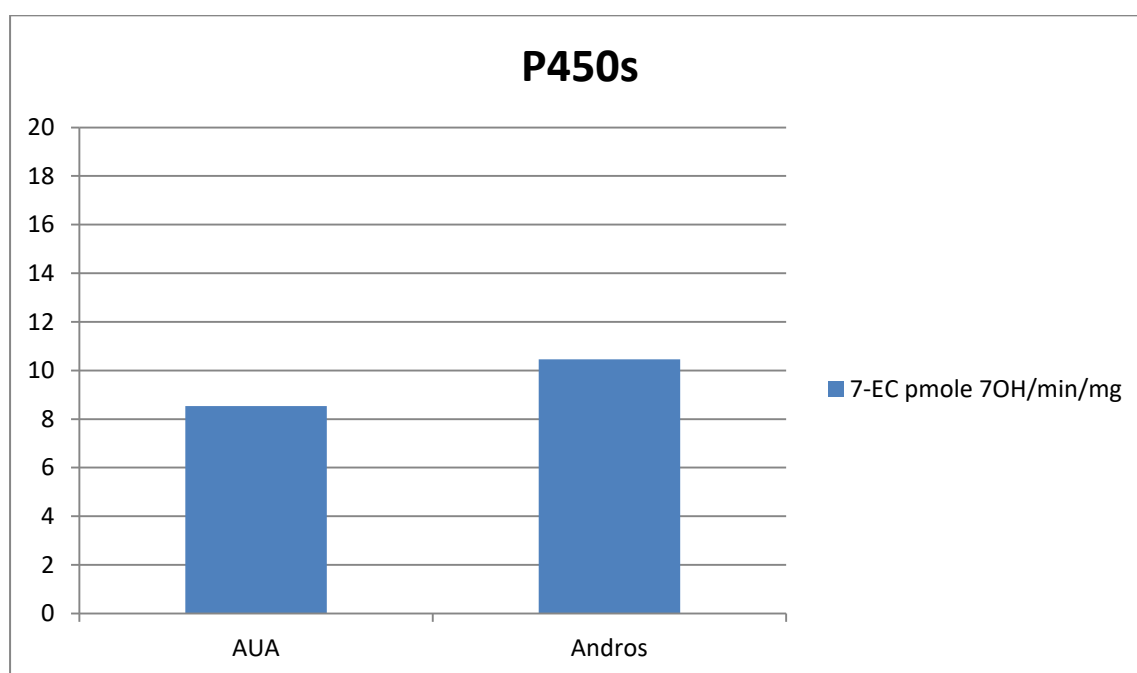
Διάγραμμα 5: Ενεργότητα εστερασών με 1 naphthyl acetate



Διάγραμμα 6: Ενεργότητα εστερασών με 2 naphthyl acetate

Ενεργότητα των P450 οξειδασών

Όλοι οι υπό μελέτη πληθυσμοί δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ενεργότητα των P450 οξειδασών. Πιο συγκεκριμένα, μετά τη μέτρηση ενεργότητας των P450 οξειδασών στο ενζυμικό υπόστρωμα 7-Ethoxycoumarin δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ του ανθεκτικού πληθυσμού *Andros* και του ευαίσθητου *AUA* (Διάγραμμα 7).



Διάγραμμα 7: Ενεργότητα P450s με 7-Ethoxycoumarin

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αναλύοντας τα αποτελέσματα της ενεργότητας της ακετυλοχολινεστεράσης και των ενζύμων αποτοξικοποίησης (εστερασών, GSTs και P450s) παρατηρήθηκε ότι ο ανθεκτικός πληθυσμός *Andros* δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές με τον ευαίσθητο πληθυσμό *AUA* όσον αφορά την ενεργότητα της ακετυλοχολινεστεράσης, των εστερασών και των μονοοξυγwnασών. Στην περίπτωση όμως των μεταφορασών της γλουταθειόνης (GSTs) παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ του ευαίσθητου και του ανθεκτικού πληθυσμού. Πιο συγκεκριμένα στο υπόστρωμα monochlorobimane η ενεργότητα των GSTs εμφανίζεται σε μεγαλύτερα μεγέθη στον ευαίσθητο πληθυσμό έναντι του ανθεκτικού.

ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το *Varroa destructor* είναι ένα παράσιτο των μελισσών που έχει εξαπλωθεί σχεδόν σε όλο τον κόσμο. Αποτελεί το σοβαρότερο εχθρό των μελισσών και η χημική καταπολέμηση χαρακτηρίζεται αναγκαία για την διατήρηση του σε τέτοια επίπεδα ώστε να μη δημιουργεί σοβαρά προβλήματα στο μέλισσι. Η έλλειψη ποικιλίας δραστικών ουσιών και ο περιορισμός των εναλλαγών μεταξύ των χημικών σκευασμάτων έχει οδηγήσει στην επαναλαμβανόμενη χρήση αυτών με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανθεκτικότητας του ακάρεος στις δραστικές ουσίες. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση και χαρακτηρισμός της ανθεκτικότητας ελληνικών πληθυσμών *Varroa destructor* σε ακαρεοκτόνα όπως αυτοί επιλέχθηκαν βάση ενδείξεων και βεβαρημένου ιστορικού.

Για αυτό το σκοπό επιλέχθηκαν 3 ύποπτοι πληθυσμοί από Νάξο και Άνδρο και συγκρίθηκαν με τον ευαίσθητο πληθυσμό του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Μετά από την εφαρμογή κλασσικών μεθόδων βιοδοκιμών των πληθυσμών αυτών σε τρία ακαρεοκτόνα (*amitraz*, *τ-fluvalinate*, *coumaphos*) που χρησιμοποιεί η πλειοψηφία των ελλήνων μελισσοκόμων, παρατηρήθηκε ανθεκτικότητα και των τριών πληθυσμών στη δραστική ουσία *coumaphos*. Μεγαλύτερη ανθεκτικότητα παρουσίασε ο πληθυσμός *Andros* ενώ υψηλά ποσοστά παρουσίασαν οι πληθυσμοί *Naxos#A*, *Naxos#B*. Αντίθετα στις δραστικές ουσίες *amitraz*, *τ-fluvalinate* κανένας πληθυσμός δεν παρουσίασε ανθεκτικότητα.

Για να μελετηθούν οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας του ανθεκτικού πληθυσμού *Andros* προχωρήσαμε σε εφαρμογή κλασσικών μεθόδων βιοδοκιμών με χρήση παρεμποδιστών των ενζύμων αποτοξικοποίησης (PBO, DEF) και τα αποτελέσματα ήταν εντυπωσιακά καθώς η επίδραση των ενζυμικών παρεμποδιστών ήταν καθοριστική. Ακολούθησε, έλεγχος της ενεργότητας της ακετυλοχολινεστεράσης καθώς και των ενζυμικών συστημάτων που είναι υπεύθυνα για την αποτοξικοποίηση των εντομοκτόνων και ακαρεοκτόνων (εστεράσες, μικτής λειτουργίας P450 οξειδάσες και μεταφοράσες της γλουταθειόνης (GSTs)). Η ενεργότητα της ακετυλοχολινεστεράσης βρέθηκε σε κοντινά επίπεδα στον ανθεκτικό και στον ευαίσθητο πληθυσμό καθώς και το IC50 με δυο οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα δεν είχε στατιστικές σημαντικές

διαφορές μεταξύ των δυο πληθυσμών. Επίσης τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι μόνο στη περίπτωση των GSTs υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ του ανθεκτικού και του ευαίσθητου πληθυσμού. Σύμφωνα με τους Thomas van Ieewen και John Vontas (2009) τα επίπεδα των ενζύμων αποτοξικοποίησης βρίσκονται σε αυξημένα επίπεδα στους ανθεκτικούς πληθυσμούς ούτως ώστε να μεταβολίζουν το εντομοκτόνο και να προσδίδουν στο έντομο την ανθεκτικότητα που το χαρακτηρίζει. Στη περίπτωση του πληθυσμού *Andros* τα επίπεδα ενεργότητας των GSTs βρίσκονται σε σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά στο υπόστρωμα monochlorobimane σε σύγκριση με τον ευαίσθητο πληθυσμό *Aua*. Μια εκτίμηση του συγκεκριμένου αποτελέσματος είναι μια πιθανή μεταλλαγή ορισμένων GSTs που προσδίδουν ανθεκτικότητα στον ανθεκτικό πληθυσμό και η οποία είναι υπεύθυνη για την μειωμένη ενεργότητα των GSTs στο υπόστρωμα monochlorobimane. Αντίστοιχη περίπτωση εμφανίστηκε όταν ο Jacob Riveron et al. (2014) απέδειξε ότι μια μεταλλαγή στις GSTe2 ήταν υπεύθυνη για τη βιοχημική ανθεκτικότητα του *Anopheles funestus* έναντι του DDT και πυρεθρινοειδών εντομοκτόνων. Επίσης απέδειξε ότι οι GSTe2 ήταν το πιο υπερεκφρασμένο ένζυμο αποτοξικοποίησης των ανθεκτικών στα πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα κουνουπιών.

Η απουσία διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ των ακαρεοκτόνων, η χρήση ενζυμικών παρεμποδιστών (PBO και DEF), η ενεργότητα της ακετυλοχολινεστεράσης, το IC50 και η βιοχημική ανάλυση των ενζυμικών συστημάτων μας δείχνουν ότι πιθανότατα κάποιος βιοχημικός μηχανισμός είναι υπεύθυνος για την υψηλή ανθεκτικότητα του πληθυσμού *Andros* και όχι κάποια μεταλλαγή που δεν επιτρέπει τη πρόσδεση του εντομοκτόνου στο σημείο στόχο (ανθεκτικότητα στόχου). Παρόλα αυτά χρειάζεται περαιτέρω μελέτη και έρευνα ώστε να διερευνηθεί πλήρως ποιός ενζυμικός μηχανισμός ευθύνεται για την ύπαρξη της ανθεκτικότητας.

Στην σημερινή εποχή η κατακόρυφη αύξηση των απαιτήσεων για ανάπτυξη νέων φυτοπροστατευτικών προϊόντων έχει ως αποτέλεσμα το συνεχώς αυξανόμενο κόστος για την ανάπτυξη νέων φ.π. αλλά και την απόσυρση των παλαιών δραστικών μορίων λόγω ελλιπούς υποστήριξης από τις εταιρείες γεωργικών φαρμάκων. Οι εταιρίες περιορίζουν την έρευνα και στρέφονται σε τυποποιημένα μόρια παλαιών φ.π. και σε βελτιωμένα σκευάσματα. Ο κίνδυνος σοβαρής μείωσης επαρκών και αποτελεσματικών

δραστικών ουσιών είναι πλέον υπαρκτός. Το πρόβλημα της ανθεκτικότητας δεν μπορεί να βασιστεί στην παραγωγή νέων δραστικών ουσιών και η εναλλαγή εντομοκτόνων δεν αποτελεί πάντα λύση. Για την διαχείριση της ανθεκτικότητας η γνώση των μηχανισμών και η έγκαιρη διάγνωση αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση. Στα πλαίσια της ολοκληρωμένης διαχείρισης τα διαγνωστικά ανθεκτικότητας αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο για την ορθολογική διαχείριση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων.

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΑ ΣΧΕΔΙΑ

Η εύρεση νέων ανθεκτικών πληθυσμών και η ανάπτυξη διαγνωστικών μεθόδων είναι πολύ σημαντική και θα μας βοηθήσει στην διαχείριση της ανθεκτικότητας. Σκοπός μας είναι η αναζήτηση και εξέταση πληθυσμών από διάφορα μέρη της Ελλάδας ώστε να γίνει μια καταγραφή ανθεκτικών πληθυσμών και σε συνάρτηση με το ιστορικό των θεραπειών που έγιναν και της ανάλυσης των μηχανισμών ανάπτυξης ανθεκτικότητας των *Varroa* να μπορέσουμε να αντιμετωπίσουμε αυτόν τον σοβαρό εχθρό των μελισσών στα πλαίσια ολοκληρωμένης διαχείρισης. Εξέταση των πληθυσμών τόσο με κλασσικές μεθόδους βιοδοκιμών χωρίς χρήση παρεμποδιστών των ενζύμων αποτοξικοποίησης όσο και με τη χρήση αυτών θα μας βοηθήσουν να αντιληφθούμε καλύτερα αν ο μηχανισμός ανθεκτικότητας οφείλεται σε πιθανή μεταλλαγή του σημείου στόχου ή στη δράση ενζύμων αποτοξικοποίησης. Η εφαρμογή μοριακών διαγνωστικών για γενотύπηση μοριακών μεταλλαγών ανθεκτικότητας σε ακαρεοκτόνα με τις μοριακές μεθόδους PCR-RFLP (*PCR-restriction fragment length polymorphism*) και PCR-PASA (*PCR amplification of specific alleles*) θα μας βοηθήσουν να εντοπίσουμε μεταλλαγές σε συγκεκριμένα νουκλεοτίδια του γονιδιώματος τα οποία πιθανόν να σχετίζονται με ανθεκτικότητα του *Varroa* σε ακαρεοκτόνα. Επίσης θα γίνει αλληλούχιση γονιδίων στόχου (AChE) για ανίχνευση μεταλλαγών που σχετίζονται με ανθεκτικότητα του *Varroa* σε οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά εντομοκτόνα που έχουν σαν στόχο την ακετυλοχολινεστεράση (AChE). Με τη μέθοδο new generation transcriptomics (RNA – gene expression) δηλαδή μελέτη έκφρασης και αλληλουχίας γονιδίων που σχετίζονται με ανθεκτικότητα στόχου θα δούμε αν υπάρχει διαφοροποίηση όσον αφορά την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στα OPs. Η υπερέκφραση γονιδίων συνδέεται με αυξημένα επίπεδα CCE transcripts στους ανθεκτικούς πληθυσμούς. Εφόσον βρούμε τα γονίδια θα ακολουθήσει ποσοτικός προσδιορισμός των CCE transcripts με τη χρήση qPCR τόσο για τους Susceptible όσο και για τους Resistant πληθυσμούς.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Davies T.G.E., Field L.M., Usherwood P.N.R. and Williamson M.S. (2007), DDT, Pyrethrins, Pyrethroids and Insect Sodium Channels. Critical Review. IUBMB Life, 59 : 151 – 162
- Hemingway, J., Hawkes, N.J., McCarroll, L., Ranson, H. (2004), The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes Insect Biochem Mol Biol, 34 : 653-665
- Mutero A., Pralavorio, M., Bride, J.M. and Fournier, D. (1994), Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 : 593-602
- Nauen R., Stumpf N. (2002), Fluorometric microplate assay to measure Glutathione S-transferase activity in insects and mites using monochlorobimane, Anal. Biochem. 303 :194-198
- Pelekasis, K. D., Santas, L. A., Emmanuel, N. G., (1979). Varroa disease in Greece (Distribution, Morphology-Control measures). XXVIIth Intern. Congr. off Apiculture of Apimondia 359-365 Apimondia publishing House, Bukuresti, Romania.
- Riveron et all. (2014). A single mutation in the GSTe2 gene allows tracking of metabolically based insecticide resistance in a major malaria vector.
- Santas, L. A., Emmanuel, N. G., Pelekasis, K. D., (1983). The present status and further developments on control of Varroa disease in Greece. In proceeding of XXIX Intern. Congr. of Apiculture Apimondia, Budapest, Hungary, 25-31 August.
- Scott J.G. (1999), Cytochromes P450 and insecticide resistance, Insect. Biochem. Mol. Biol. 29 : 757-777
- Van Leeuwen T., Vontas J. (2010). Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite Tetranychus urticae and other important Acari: A review

- Van Leeuwen T., Van Pottelberge S., Tirry L. 2005, Comparative acaricide susceptibility and detoxifying enzyme activities in field-collected resistant and susceptible strains of *Tetranychus urticae* . Pest Manag. Sci. 61 : 499-507
- Vontas J.G., Small G.J., and Hemingway J. 2001.a, Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*, Biochem. J. 357 : 65-72
- Wei S.H 2001. Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticideresistant strain of the housefly *Musca domestica*
- Αεράκη Α. 2006. Βαρροϊκή ακαρίαση, ιστορία, βιολογικός κύκλος, τρόποι αντιμετώπισης.
- Αλυσσανδράκης, Ε., Χαριζάνης, Π., 2001. Η Ολοκληρωμένη Αντιμετώπιση της Βαρροϊκής Ακαρίασης και το Μέλλον της Μελισσοκομίας. Μελισσοκομική επιθεώρηση, 15 (9): 396-400.
- Βόντας Ι., Ροδιτάκης Ε. και Τσαγκαράκου Α. 2007. Η μοριακή βάση της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα: παραδείγματα εντόμων και ακάρεων Ελληνικού ενδιαφέροντος, Γεωτεχνικά επιστημονικά θέματα, 18: 60-68
- Ζιώγας Β.Ν., Μαρκόγλου Α. 2007. Γεωργική Φαρμακολογία, Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί Δράσης και Χρήσεις των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων
- Καραζαφείρης, Ε., 2004. Διασπορά του coumaphos στις κηρήθρες από την εφαρμογή των Check Mite strips 10%. Πρακτικά 2^{ου} Επιστημονικού Συνεδρίου Μελισσοκομίας-Σηροτροφίας, Αθήνα, 75-78.
- Πελεκάσης, Κ. Δ., Σαντάς, Λ. Α., Εμμανουήλ, Ν. Γ., 1978. Βαρροϊκή ακαρίαση. Μια νέα για την Ελλάδα σοβαρή ασθένεια των μελισσών. ΜΕΛΙΣΣΑ 23: 1-7.
- Σαντάς, Λ. Α., 1990. Προβλήματα μελισσοσηγνών, Αθήνα.

Χαριζάνης Π. 2014. Μέλισσα και Μελισσοκομική Τεχνική. Τρίτη Έκδοση. Αθήνα. 277 σελ.

Χατζήνα Φ. 2013. Φαρμακευτικές ουσίες με χρήση στη μελισσοκομία. Ινστιτούτο Μελισσοκομίας – ΕΛΓΟ «Δήμητρα»

Υφαντίδης, Μ. Δ., 1987. Μελισσοκομία. Επιστήμη και Εφαρμογή, Θεσσαλονίκη.