

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΘΡΕΨΕΩΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*Μελέτη και αξιοποίηση της Ελληνικής Φυσικής και Αγροτικής
Βιοποικιλότητας για την Ανάπτυξη Νέων Βιοκτόνων*



Βασιλική-Ναυσικά Ι. Καψάσκη-Κανελλή

Επιβλέπων:

Σέρκο Χαρουτουιάν, Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ

2020

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΘΡΕΨΕΩΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*Μελέτη και αξιοποίηση της Ελληνικής Φυσικής και Αγροτικής
Βιοποικιλότητας για την Ανάπτυξη Νέων Βιοκτόνων*

*Exploitation of Greek natural and agricultural biodiversity for the
development of novel biocides*

Βασιλική-Ναυσικά Ι. Καψάσκη-Κανελλή

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Σέρκο Χαρουτουιάν, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Στυλιανή Χαδιώ-Μάντζαρη, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Αντώνιος Μιχαηλάκης, Ερευνητής Α' ΜΦΙ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Σέρκο Χαρουτουιάν, Καθηγητής ΓΠΑ

Στυλιανή Χαδιώ-Μάντζαρη, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Ιωάννης Μπόσης, Καθηγητής ΓΠΑ

Αντώνιος Μιχαηλάκης, Τακτικός Ερευνητής Α' ΜΦΙ

Νίκος Χωριανόπουλος, Αναπληρωτής Ερευνητής Β' ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ

Αθανάσιος Παππάς, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Νικόλαος Γ. Καβαλλιεράτος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Περίληψη

Η ατέρμονη μάχη της ανθρωπότητας με τα έντομα έχει γνωρίσει ένδοξες νίκες, αλλά και καταστροφικές ήττες. Τα κουνούπια αποτελούν μία από τις πλέον οχλούσες ομάδες αιμομυζητικών εντόμων, που συχνά λειτουργούν ως φορείς σοβαρών παρασιτικών ασθενειών με σημαντικό κοινωνικό και οικονομικό αντίκτυπο. Η αντιμετώπισή τους, ωστόσο, έχει οδηγήσει σε μερικές από τις πλέον αμφιλεγόμενες νίκες της ανθρωπότητας. Οι μεγάλης κλίμακος παρεμβάσεις που έχουν κατά καιρούς επιχειρηθεί με τη χρήση συνθετικών βιοκτόνων, παρά την αρχική αποτελεσματικότητά τους, οδήγησαν σταδιακά στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας των εντόμων σε αυτά. Όμως, επέφεραν παράλληλα και μια σειρά αλληλένδετων περιβαλλοντικών, κοινωνικών και οικονομικών επιπτώσεων, με αποτέλεσμα να έχει πλέον περιοριστεί σημαντικά η χρήση τους. Σήμερα, τα προβλήματα που προκαλούν τα κουνούπια υφίστανται και εντείνονται, αφού λόγω της κλιματικής αλλαγής και της ανθρώπινης δραστηριότητας εξαπλώνονται και εγκαθίστανται σε νέους βιότοπους μη ιθαγενή είδη κουνουπιών. Έτσι, καθίσταται επιτακτική η ανάγκη ανακάλυψης νέων και περισσότερο αποτελεσματικών μεθόδων διαχείρισης των κουνουπιών, οι οποίες θα είναι φιλικές για το περιβάλλον και τον άνθρωπο.

Η φυτική βιοποικιλότητα ανέκαθεν αποτελούσε μια σημαντική για τον άνθρωπο παρακαταθήκη για την προμήθεια-ανάπτυξη μέσω της σκοπής την αντιμετώπιση των εντόμων-εχθρών. Από τα πολυποίκιλα προϊόντα που προέρχονται από τη φύση, τα αιθέρια έλαια κατέχουν μια εξέχουσα θέση, κυρίως λόγω των σημαντικών εντομο-απωθητικών και εντομοκτόνων ιδιοτήτων τους. Σήμερα, τα εθνοβοτανικά δεδομένα σε συνδυασμό με τη διαθέσιμη γνώση για τη χημική πολυπλοκότητα των αιθερίων ελαίων, έχει στρέψει ξανά το ερευνητικό ενδιαφέρον στον τομέα της μελέτης της τοξικής δράσης των ελαίων αυτών -και των συστατικών τους- με στόχο την αντιμετώπιση των υγειονομικής σημασίας κουνουπιών. Στο πλαίσιο αυτό, έχει αξιολογηθεί η βιοκτόνος δράση ενός μεγάλου αριθμού αιθερίων ελαίων από ένα ευρύ φάσμα της φυσικής βιοποικιλότητας, αφενός, λόγω της σημαντικής βιοδραστικότητας που παρουσιάζουν κάποια από αυτά, και, αφετέρου, λόγω των παρακάτω χαρακτηριστικών τους που τα καθιστούν ως ιδιαίτερα αποτελεσματικούς παράγοντες παρασιτικού ελέγχου:

- α) υψηλή βιοαποικοδομησιμότητα,
- β) μηδαμινές επιδράσεις σε έντομα επικονιαστές,
- γ) απλές και οικονομικά συμφέρουσες μέθοδοι παραλαβής, και
- δ) δυσκολία των εντόμων να αναπτύξουν ανθεκτικότητα σε αυτά.

Η εκπόνηση της παρούσας διατριβής εντάσσεται στην προσπάθεια αυτή, έχοντας ως αντικείμενο την ανάπτυξη νέων, φυσικών βιοκτόνων για την αντιμετώπιση των κουνουπιών. Για την επίτευξη του στόχου αυτού μελετήθηκαν 67 αιθέρια έλαια που παραλήφθηκαν από επιλεγμένα φυτικά μέρη της ελληνικής βιοποικιλότητας. Στο πρώτο μέρος της διατριβής μελετήθηκε η χημική σύστασή τους και η δραστικότητά τους (απωθητική και προνυμφοκτόνος), έναντι του χωροκατακτητικού είδους *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) (Ασιατικό κουνούπι Τίγρης). Παράλληλα, αξιολογήθηκε μια σειρά κρίσιμων παραγόντων (εποχιακή διακύμανση, μηχανική επεξεργασία, βιομηχανική επεξεργασία) που αφορούν τις προοπτικές και δυνατότητες αξιοποίησης των σχετικών αποτελεσμάτων. Αναλυτικότερα, κατά τη διενέργεια της διατριβής μελετήθηκαν-αξιολογήθηκαν αιθέρια έλαια που προέρχονται από τις παρακάτω τρεις ευδιάκριτες ομάδες φυτών της ελληνικής βιοποικιλότητας:

A) Αυτοφυής Βιοποικιλότητα - Το γένος *Juniperus*

Από τα αυτοφυή είδη των κέδρων *Juniperus phoenicea* και *Juniperus drupacea* παραλήφθηκαν με υδρο-απόσταξη συνολικά 33 αιθέρια έλαια, τα οποία προέρχονται από δείγματα φύλλων και καρπών τριών διαφορετικών αναπαραγωγικών σταδίων των δέντρων, εκ των οποίων ένα τμήμα προορίστηκε απ' ευθείας για υδρο-απόσταξη, ενώ το δεύτερο υπέστη μηχανική προ-επεξεργασία, η οποία αφορούσε τον τεμαχισμό των φύλλων και τον θρυμματισμό των καρπών. Τα 24 από αυτά, εμφάνισαν ικανοποιητικές αποδόσεις αιθερίων ελαίων και κρίθηκαν ως τα πλέον κατάλληλα προς αξιοποίηση. Για αυτά προσδιορίστηκε η προνυμφοκτόνος και απωθητική δράση έναντι του είδους *Ae. albopictus*. Σύμφωνα με τα αναλυτικά αποτελέσματα η χημική σύσταση των αιθερίων ελαίων αποτελείται από μονοτερπένια, κυρίως κυκλικά και κάποια αλειφατικά, και σε μικρότερο ποσοστό από διτερπένια. Μεταξύ τους, τα αιθέρια έλαια των δύο ειδών *Juniperus* διακρίνονται ως προς το κυρίαρχο συστατικό τους, το οποίο για το είδος *J. phoenicea* είναι το α-πινένιο και για το *J. drupacea* είναι το λεμονένιο. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η μηχανική επεξεργασία του φυτικού υλικού -τεμαχισμός των φύλλων και θρυμματισμός των καρπών- πριν από την υδρο-απόσταξη αυξάνει την απόδοση των αιθερίων ελαίων. Τέλος, προσδιορίστηκε ότι οι ώριμοι καρποί των φυτών αυτών είναι το φυτικό μέρος με την με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε αιθέρια έλαια. Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών έδειξαν ότι τρία από τα αιθέρια έλαια που μελετήθηκαν διαθέτουν ισχυρή προνυμφοκτόνο δράση, ενώ η απωθητική δράση 12 αιθερίων ελαίων είναι παρόμοια με αυτή του DEET (το συνθετικό μόριο με την ισχυρότερη απωθητική δράση). Επίσης, αξίζει να επισημανθεί ότι τέσσερα αιθέρια έλαια τα οποία παραλήφθηκαν από τα δείγματα φύλλων των δύο ειδών εμφάνισαν ταυτόχρονα ισχυρή προνυμφοκτόνο και

απωθητική δράση.

B) Αγροτική Βιοποικιλότητα - Το γένος *Citrus*

Από την αγροτική βιοποικιλότητα μελετήθηκαν τα αιθέρια έλαια που προκύπτουν ως παραπροϊόντα της βιομηχανικής επεξεργασίας -με τη μέθοδο της κρυσσυμπίεσης- των καρπών των ειδών *Citrus sinensis* (πορτοκάλι), *C. limon* (λεμόνι), *C. x paradise* (γκρέϊπφρουτ) και *C. reticulata* (μανταρίνι). Τα τέσσερα αυτά βιομηχανικά παραπροϊόντα υποβλήθηκαν σε υδρο-απόσταξη προκειμένου να ανακτηθεί καθαρό το πτητικό τους κλάσμα, από το οποίο στη συνέχεια παραλήφθηκαν δύο επιμέρους κλάσματα, ανάλογα με τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν. Επιπλέον, με τη μέθοδο της κλασικής υδρο-απόσταξης παραλήφθηκαν τα αιθέρια έλαια των καρπών των παραπάνω ειδών, όπως και των ειδών *C. x aurantium* (νεράντζι) και *C. japonica* (κουμ κουάτ). Στα 18 αιθέρια έλαια που προέκυψαν συνολικά προσδιορίστηκε η χημική σύσταση και η βιοδραστικότητα (προνυμφοκτόνος και απωθητική) κατά του είδους *Ae. albopictus*. Το ποσοστό ανάκτησης των πτητικών ουσιών από τα βιομηχανικά αιθέρια έλαια κυμάνθηκε μεταξύ 74-88%. Η συγκέντρωση του κύριου συστατικού τους (λεμονένιο) αυξήθηκε σημαντικά σε όλα τα δείγματα που προέκυψαν από την υδροαπόσταξη των βιομηχανικών παραπροϊόντων και κορυφώθηκε στο 2^ο κλάσμα του μανταρινιού (*C. reticulata*), στο οποίο αντιπροσωπεύει το 97% του αιθερίου ελαίου. Παράλληλα, η επεξεργασία αυτή των βιομηχανικών παραπροϊόντων οδήγησε στην αύξηση της βιοδραστικότητας των αιθερίων ελαίων, με σημαντικότερη την κατά 1100% και 1300% ενίσχυση της προνυμφοκτόνου δράσης των πτητικών κλασμάτων του γκρέϊπφρουτ. Συνολικά, από τα αιθέρια έλαια που μελετήθηκαν τα τρία αξιολογήθηκαν ως αποτελεσματικά προνυμφοκτόνα και τα πέντε ως ισχυρά απωθητικά. Δύο αιθέρια έλαια που προέκυψαν απ' ευθείας από τους καρπούς του πορτοκαλιού και του κουμ-κουάτ εμφάνισαν ταυτόχρονα ισχυρή προνυμφοκτόνο και απωθητική δράση.

Γ) Ελληνικά αρωματικά-αρτυματικά φυτά

Από την πληθώρα των ελληνικών αρωματικών-αρτυματικών φυτών επελέγησαν προς μελέτη αυτοφυή taxa των οικογενειών *Apiaceae*, *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Solanaceae* και *Rutaceae*. Στο πλαίσιο αυτό, απομονώθηκαν συνολικά 16 αιθέρια έλαια, εκ των οποίων τα επτά δεν μελετήθηκαν περαιτέρω, εξαιτίας των χαμηλών αποδόσεων που εμφάνισαν. Στα υπόλοιπα εννέα, που προέρχονται από τις Οικογένειες *Apiaceae*, *Lamiaceae* και *Rutaceae*, προσδιορίστηκε το φυτοχημικό περιεχόμενο και η βιοδραστικότητα έναντι του είδους *Ae. albopictus*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τέσσερα από τα αιθέρια έλαια διαθέτουν ισχυρή προνυμφοκτόνο και έξι ισχυρή απωθητική δράση. Μεταξύ αυτών, τα αιθέρια έλαια των ειδών *Thymbra capitata*, *Origanum onites* και *Satureja thymbra* (όλα της οικογένειας *Lamiaceae*),

με κοινό χαρακτηριστικό τους ότι έχουν ως κύριο συστατικό την καρβακρόλη, εμφάνισαν ταυτόχρονα ισχυρή προνυμφοκτόνο και απωθητική δράση, αναδεικνύοντας τα πλούσια σε καρβακρόλη αιθέρια έλαια (Π.Κ.Α.Ε.) ως σημαντικά υποσχόμενους παράγοντες ελέγχου των κουνουπιών.

Το δεύτερο μέρος της διατριβής αναφέρεται στην εξελικτική πορεία της ανάπτυξης, των Π.Κ.Α.Ε. της ρίγανης, της πλέον πρόσφορης προς περαιτέρω ανάπτυξη ομάδας αιθερίων ελαίων, από το επίπεδο των εργαστηριακών βιοδοκιμών στις εφαρμογές πεδίου. Στο πλαίσιο αυτό αναζητήθηκε προς επιλογή και περαιτέρω ανάπτυξη ένα ευρέως διαθέσιμο-καλλιεργούμενο ταxon, με αντίστοιχα χαρακτηριστικά (απόδοση, περιεχόμενο, βιοδραστικότητα), το οποίο θα είναι ικανό να παράγει σημαντικές ποσότητες Π.Κ.Α.Ε. Ως τέτοιο επελέγη η εμπορική ποικιλία *Origanum vulgare* ssp. *hirtum*. Για το αιθέριο έλαιο του φυτού αυτού διενεργήθηκαν μελέτες δόσης-απόκρισης και οικο-τοξικότητας, δείχνοντας ότι διαθέτει σημαντική προνυμφοκτόνο (LC_{90} : 58,747 mg/L) και απωθητική δράση ($0,2 \mu\text{L}/\text{cm}^2$), ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζει υψηλή τοξικότητα (LC_{90} : 12,806 mg/L) στο είδος *Macrocyclops albidus*. Με βάση την τελευταία τιμή προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των διαλυμάτων που εφαρμόστηκαν στις δοκιμές πεδίου για την μελέτη της προνυμφοκτόνου δράσης εναντίον των κουνουπιών *Culex ripiens* (κοινό κουνούπι) και *Ae. albopictus*. Για την εκτίμηση της απωθητικής δράσης χώρου χρησιμοποιήθηκε η διπλάσια της ελάχιστης συγκέντρωσης ($0,4 \mu\text{L}/\text{cm}^2$). Οι δοκιμές προνυμφοκτονίας στο πεδίο έγιναν χρησιμοποιώντας είτε καθαρό αιθέριο έλαιο είτε μίγμα αιθερίου ελαίου με γαλακτοματοποιητή, το οποίο χρησιμοποιήθηκε και στις δοκιμές απωθητικότητας χώρου. Η απωθητική δράση χώρου του γαλακτώματος ήταν μέγιστη την πρώτη ημέρα μετά την εφαρμογή (86%) και σταδιακά εξασθένησε τις επόμενες δύο ημέρες (81% και 69%). Αντίθετα, κατά τις δοκιμές της προνυμφοκτόνου και απωθητικής δράσης σε λεκάνες απορροής ομβρίων υδάτων, τόσο το αιθέριο έλαιο όσο και το γαλάκτωμα αποδείχθηκαν ιδιαίτερα αποτελεσματικά, με το πρώτο (τρεις εβδομάδες) να παρουσιάζει σχετικά μεγαλύτερη διάρκεια σε σχέση με το δεύτερο (δύο εβδομάδες). Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι οι σχετικοί ψεκασμοί που διενεργούνται στην Περιφέρεια Emilia Romagna της Ιταλίας, όπου υλοποιήθηκαν οι δοκιμές πεδίου, με χρήση συνθετικών εντομοκτόνων επαναλαμβάνονται κάθε τρεις εβδομάδες (μέγιστη διάρκεια δράσης συνθετικού εντομοκτόνου), το προϊόν που αναπτύχθηκε στο πλαίσιο διενέργειας της διατριβής είναι δυνατόν να αποτελέσει ένα πολλά υποσχόμενο εναλλακτικό φυσικό εντομοκτόνο.

Επιστημονική περιοχή: Φυσικά βιοκτόνα

Λέξεις κλειδιά: αιθέρια έλαια, ελληνική βιοποικιλότητα φυτών, κουνούπι, προνυμφοκτόνα, απωθητικά, *Juniperus*, *Citrus*, *Origanum*, καρβακρόλη, δοκιμή πεδίου

Summary

The eternal struggle of mankind against insects throughout history has faced both glorious victories and disgraceful defeats. Mosquitoes, besides being the most annoying group of all bloodsucking arthropods, they also act as transmitters of various serious diseases with severe and diverse social and financial consequences. Thus, the struggle against mosquitoes has become the favorite target of this fight, emerging as the field of the most controversial victories of mankind against insects. The large-scale intervention with synthetic pesticides, although effective, consists a major threat for public health since their use has resulted in the development of resistant mosquito populations that generated a series of intercrossing economic and environmental impacts. Nowadays, globalization of trade and travel has facilitated the spread of non-native mosquito species across the earth, whereas the ongoing effects of climate change enhance the establishment of permanent populations in new environments. Therefore, the demand for the development of new, more potent and environmentally safe products for mosquito control has emerged.

Plant biodiversity has always been a great source of means humankind exploited for the control of harmful-insects. Among the numerous plant-deriving products, essential oils (EOs) constitute a class of very potent natural bioactive compounds. Today, ethnobotanical knowledge on EOs in combination with their known chemical diversity has led to ongoing research for exploitation of these oils and their constituents in pest control. In this context, a large number of EOs have been screened for their potential as mosquito control agents, due to their high bioactivity but also because they congregate a combination of crucial and highly desirable characteristics, such as:

- 1) fast degradation
- 2) low toxicity to non-target insects and animals
- 3) simple and economical extraction methods
- 4) the natural diversity of their constituents addresses effectively the problem of resistance development.

Present thesis, established on this broader framework, aims to contribute to the effort of novel, natural biocidal product development for the control of mosquitoes. To achieve this goal, 67 EOs retrieved by selected plant parts of Greek biodiversity were studied. In the first part of the thesis, their chemical composition and their biocidal potency (repellent and larvicidal) was studied against the invasive mosquito species *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894)

(Asian Tiger mosquito), while a combination of crucial factors (seasonal variation, mechanical processing, industrial processing) were evaluated concerning the prospects for exploiting the relevant results. More specifically, EOs derived from the following three distinct groups of Greek plant biodiversity were evaluated:

A) Indigenous Biodiversity - The genus *Juniperus*

The seasonal variation in respect to the yield and chemical composition of 33 EOs isolated from various parts (leaves and fruits) of two indigenous in Greece *Juniperus* species (family Cupressaceae), namely *Juniperus drupacea* and *Juniperus phoenicea*, were determined by GC and GC/MS analysis. In terms of yield performance, 24 EOs were considered to be the most suitable for further exploitation and, therefore, their larvicidal and repellent activity against *Ae. albopictus* was evaluated. The analytical data indicated that the EOs mainly consisted of monoterpenes, mostly cyclic and only occasionally aliphatic and to a lesser percent diterpenes. The EO constituent's study in between the two *Juniperus* taxa revealed a fundamental discriminating character for all EOs in the form of the major compound, which was α -pinene for the *J. phoenicea* EOs and limonene for the *J. drupacea* EOs. The EO's yield sharply increased when the plant material was subjected to mechanical pretreatment before steam distillation. Additionally, the berries proved to be the plant part of choice considering the EO yield, which increased its content through the maturing process. Bioactivity assessments indicated that three of the studied EOs possess very potent larvicidal properties and 11 EOs display significant repellent activities since they were proved to be DEET-like (synthetic molecule with the strongest repellent effect). Finally, three EOs retrieved from leaf samples of the two namely *Juniperus* species display both significant larvicidal and repellent potency.

B) Agricultural Biodiversity - The Genus *Citrus*.

In the context of utilizing Citrus juice industry's by-products as alternative bioactive natural product resources, four crude Cold Pressed Essential Oils (CPEOs), derived from orange (*C. sinensis*), lemon (*C. limon*), grapefruit (*C. x paradisi*) and mandarin (*C. reticulata*) were studied. All CPEOs were subjected to water distillation in order to obtain the volatile fragment, which was further fractionated with respect to distillation period in two parts, concluding to eight samples. Six EOs were retrieved by classical hydro-distillation of the above four fruits as well as bitter orange (*C. aurantium*) and kumquat (*C. japonica*). These samples along with the four original CPEOs, 18 in total, were assessed in relation to their yield, phytochemical content and their repellent and larvicidal properties against *Ae. albopictus*. The volatile's recovery rates ranged from 74% to 88% of the CPEO. Limonene presented a significant increase in all samples

ranging from 8% to 52% of the respective CPEO's content and peaked in mandarin's 2nd volatile fragment which comprised 97% of the essential oil. The refinement process led to a significant increase in larvicidal potency, annotated best by the improvement by 1100% and 1300% of the grapefruit volatile fractions. Overall, from the EOs studied, three were evaluated as effective larvicides and five as strong repellents. Two EOs, retrieved directly by hydro-distillation of orange and kumquat fruits appeared to have both a significant larvicidal and repellent effect against *Ae. albopictus*.

C) Greek aromatic-culinary herbs

The biodiversity sampling in this group was performed through the selection of 15 aromatic-culinary herbs of the families Apiaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Solanaceae and Rutaceae. Nine, of the 16 in total, EOs which were retrieved via hydro-distillation in satisfying yields were further assessed in relation to their phytochemical content and biocidal potency (repellent and larvicidal) against *Ae. albopictus*. According to the results, four of the studied EOs presented a highly potent larvicidal activity and six revealed a strong repellent effect. Among them, three Lamiaceae EOs, derived from *Satureja thymbra*, *Origanum onites* and *Thymbra capitata*, which all presented **carvacrol** as principal component, exhibited DEET-like repellent performance and total larvae mortality, defining the **carvacrol rich essential oil (CREO)** as a promising mosquito control agent.

The second part of the thesis aimed in developing a streamlined process for the valorization of the bio-prospecting results in product development charting the path from the laboratory bench to field assessment. According to the aforementioned bio-prospecting results the *Origanum* CREOs emerged as the most suitable, in terms of yield, content and bioactivity, group of EOs for further development. In this context, a widely available-cultivated *taxon* capable of producing significant quantities of CREO was sought. For this purpose, a commercial variety of *Origanum vulgare ssp. hirtum*, was selected and subjected to dose-response and eco-toxicity studies prior to the field assessments. The CREO presented significant larvicidal (LC90 of 58,747 mg/L), and repellent (0,2 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$) properties, but also severe toxicity (LC90 of 12,806 mg/L) against the non-targeted organism *Macrocyclops albidus*. This last figure was the limit for the larvicidal field assessment; while for the repellent evaluation was used double the minimum indication (0,4 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$). CREO was tested per se as larvicidal agent, and emulsified for both repellent and larvicidal field activity. The emulsified CREO's spatial repellent assessment showed maximum efficacy of 86% in day 1 that gradually

declined in the following 2 days (81%, 69%). Both emulsified and crude CREO proved to be efficient larvicidal agents, with crude CREO (3 weeks) overrunning slightly the emulsified (2 weeks) in terms of endurance. In conclusion, taking into account that the treatments using synthetic insecticides carried out in the Emilia Romagna Region of Italy, where the field tests took place, are repeated every three weeks (maximum duration of synthetic insecticide action), the product developed in the context of the present thesis may be considered as a promising natural mosquito control agent, applicable in both precautionary and emergency response measures.

Scientific area: Natural biocides

Key words: essential oil, Greek plant biodiversity, mosquito, larvicidal, repellent, *Juniperus*, *Citrus*, *Origanum*, carvacrol, field test

*Στον Δημήτρη,
την Αντιγόνη,
τον Μιχάλη.*

Ευχαριστίες

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, ενώ μέρος των πειραμάτων υλοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γεωργικής Εντομολογίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου.

Ως ελάχιστη δυνατή μνεία, οφείλω στο σημείο αυτό να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνησή της. Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή Σέρκο Χαρουτουγιάν για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, για την καθοδήγηση, τις συμβουλές και τις πολύτιμες υποδείξεις του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την κατανόηση και την υπομονή που επέδειξε μέχρι να ολοκληρωθεί με επιτυχία το εγχείρημα αυτό.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω να αποδώσω στο συνάδελφο και φίλο Επαμεινώνδα Ευεργέτη για την πίστη του στο πρόσωπό μου, η οποία ήταν αυτή που στήριξε ουσιαστικά την παρούσα διατριβή. Η αγάπη του για τη βοτανική, ο ανατρεπτικός τρόπος σκέψης και το ανήσυχο πνεύμα του είναι για μένα η σημαντικότερη προσφορά του τα τελευταία αυτά έτη της γνωριμίας μας.

Ευχαριστώ θερμά τον Τακτικό Ερευνητή Α΄ του ΜΦΙ Δρα Αντώνιο Μιχαηλάκη, μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, για την πολύτιμη συμβολή και συμμετοχή του στην επίτευξη των στόχων της παρούσας διατριβής, κυρίως, όσον αφορά τη διενέργεια των βιοδοκιμών στο Εργαστήριο Γεωργικής Εντομολογίας του ΜΦΙ, αλλά και των πειραμάτων πεδίου. Από το Τμήμα Γεωργικής Εντομολογίας του ΜΦΙ ευχαριστώ, επιπλέον, τους Δημήτριο Παπαχρήστο, Ευάγγελο Μπαδιεριτάκη και Γεώργιο Μπαλατσό για τη βοήθειά τους αναφορικά με τους «μικρούς ενοχλητικούς δαίμονες» *Aedes albopictus* που αποτέλεσαν το στόχο των βιοδοκιμών της παρούσας διατριβής. Οι δοκιμές πεδίου στην Περιφέρεια Emilia Romagna της Ιταλίας δεν θα ήταν εφικτές χωρίς την πολύτιμη συνεργασία των ερευνητών Dr Romeo Bellini, Marco Carrieri, Rodolfo Veronesi και Dr Arianna Puggioli από το Κέντρο Γεωργίας και Περιβάλλοντος “G. Nicoli” της Κρεβαλκόρης, Ιταλία.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω την εταιρεία «Αφοί Χριστοδούλου», της Βιομηχανίας Επεξεργασίας Φρούτων CHB S.A. για την ευγενική προσφορά των αιθερίων ελαίων των εσπεριδοειδών, παρα-προϊόντα της χυμοποίησης των αντίστοιχων φρούτων, που αποτέλεσαν τις πρώτες ύλες για τη διεξαγωγή μέρους των πειραμάτων της διατριβής.

Ευχαριστώ την Καθηγήτρια του ΓΠΑ κ. Χαδιώ-Μάντζαρη Στυλιανή για τη συμβολή της ως μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής: Καθηγητή του ΓΠΑ Ιωάννη Μπόση, Αναπληρωτή Ερευνητή Β΄ του ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ Νίκο Χωριανόπουλο, Επίκουρο Καθηγητή του ΓΠΑ Αθανάσιο Παππά και Επίκουρο Καθηγητή του ΓΠΑ Νικόλαο Γ. Καβαλλιεράτο για την προθυμία τους να συμμετάσχουν στην κρίση της συγκεκριμένης διατριβής.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους με τους οποίους μοιράστηκα τους εργαστηριακούς πάγκους: την Άννα Αποστόλου, την Ολυμπία Βαγγελάτου, την Έλενα Μύρτση και τον Γκρικόρ Κεϊράνοφ για τη συνεργασία, το χαμόγελο και την παρέα τους, που έδωσαν ιδιαίτερο χρώμα στις ώρες αυτές. Ευχαριστώ θερμά τη Δρ. Σοφία Κουλοχέρη για την παρότρυνσή της στην απόφαση εκπόνησης της διατριβής αυτής και τις πολύτιμες συμβουλές της κατά τη διάρκεια υλοποίησής της.

Ένα τελευταίο μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στο σύντροφό μου Δημήτρη που στάθηκε δίπλα μου σε όλες τις όμορφες, αλλά και δύσκολες στιγμές αυτών των τελευταίων χρόνων και στη μητέρα μου Αγγελική, χωρίς την ηθική και έμπρακτη υποστήριξη της οποίας δεν θα ήταν εφικτή η ολοκλήρωση της διατριβής.

Δημοσιεύσεις - Ανακοινώσεις που προέκυψαν από τη Διατριβή

Ορισμένα από τα ερευνητικά αποτελέσματα που προέκυψαν κατά τη διενέργεια της διατριβής έχουν:

A. δημοσιευτεί στα παρακάτω διεθνή επιστημονικά περιοδικά:

1. Seasonal variation and bioactivity of the essential oils of two *Juniperus* species against *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse 1894)
Parasitology Research, **2016**, 115(6), 2175–2183
2. “Gold” Pressed Essential Oil: An essay on the volatile fragment from Citrus Juice Industry By-products chemistry and bioactivity
BioMed Research International, **2017**, 1-8
3. From Bio-Prospecting to Field Assessment: Development of Plant Derived Mosquito Control Agents
Frontiers in Ecology and Evolution, **2018**, 29, 204,

B. ανακοινωθεί στο 12^ο Συνέδριο Χημείας Ελλάδος Κύπρου, Θεσσαλονίκη, 8-10 Μαΐου 2015 ως:

1. «Αιθέρια έλαια ιθαγενών στην Ελλάδα κέδρων ως υποσχόμενοι παράγοντες για τον πληθυσμιακό έλεγχο των κουνουπιών»
2. «Διερεύνηση των αιθέριων ελαίων ειδών του γένους *Citrus* για την ανάπτυξη φυσικών βιοκτόνων»

Περιεχόμενα

| | |
|---|-----------|
| Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή | 17 |
| 1.1. Φυσικά προϊόντα | 17 |
| 1.1.1. Αιθέρια έλαια | 17 |
| 1.1.2. Χημειοποικιλότητα αιθερίων ελαίων | 25 |
| 1.1.3. Εφαρμογές αιθερίων ελαίων | 27 |
| 1.2. Το πρόβλημα των κουνουπιών | 29 |
| 1.2.1. Γενικά περί κουνουπιών | 30 |
| 1.2.2. Χωροκατακτητικά είδη κουνουπιών | 32 |
| 1.2.3. Το είδος <i>Aedes (Stegomyia) albopictus</i> | 34 |
| 1.2.3.1. Βιοοικολογία του <i>Ae. albopictus</i> | 34 |
| 1.2.3.2. Εξάπλωση του <i>Ae. albopictus</i> στον κόσμο και τρόποι διασποράς | 35 |
| 1.2.3.3. Εμφάνιση και διασπορά του <i>Ae. albopictus</i> στην Ελλάδα | 37 |
| 1.2.3.4. Υγειονομική σημασία του <i>Ae. Albopictus</i> | 38 |
| 1.3. Αντιμετώπιση των κουνουπιών | 42 |
| 1.3.1. Μέθοδοι αντιμετώπισης | 43 |
| 1.3.2. Περιορισμοί στη σύγχρονη αντιμετώπιση των κουνουπιών | 55 |
| 1.3.2.1. Ανάπτυξη ανθεκτικότητας | 55 |
| 1.3.2.2. Περιβαλλοντικοί περιορισμοί | 57 |
| 1.3.2.3. Κοινωνικοί – Ηθικοί – Νομοθετικοί περιορισμοί | 62 |
| 1.3.2.4. Οικονομικοί περιορισμοί | 65 |
| 1.3.3. Τα Αιθέρια έλαια στην αντιμετώπιση των κουνουπιών | 67 |
| 1.3.3.1. Προσωπική προστασία | 68 |
| 1.3.3.2. Πληθυσμιακός έλεγχος | 76 |
| 1.4. Τα Αιθέρια έλαια της ελληνικής βιοποικιλότητας ως φυσικά βιοκτόνα | 80 |
| 1.4.1. Αυτοφυής βιοποικιλότητα - Το γένος <i>Juniperus</i> | 80 |
| 1.4.2. Αγροτική βιοποικιλότητα - Το γένος <i>Citrus</i> | 83 |
| 1.4.3. Διατροφική βιοποικιλότητα - Ελληνικά αρωματικά - αρτυματικά φυτά | 85 |
| Κεφάλαιο 2. Υλικά και Μέθοδοι | 90 |
| 2.1. Φυτικό Υλικό | 90 |
| 2.1.1. Το γένος <i>Juniperus</i> | 90 |
| 2.1.2. Το γένος <i>Citrus</i> | 92 |
| 2.1.3. Ελληνικά αρωματικά – αρτυματικά φυτά | 93 |

| | |
|---|------------|
| 2.2. Μέθοδοι | 94 |
| 2.2.1. Επεξεργασία φυτικού υλικού | 94 |
| 2.2.2. Παραλαβή αιθερίων ελαίων | 95 |
| 2.2.3. Προσδιορισμός της χημικής σύστασης των αιθερίων ελαίων | 97 |
| 2.2.4. Εκτροφή κουνουπιών | 98 |
| 2.2.5. Προσδιορισμός προνυμφοκτόνου δράσης | 98 |
| 2.2.6. Προσδιορισμός απωθητικής δράσης | 99 |
| 2.2.7. Στατιστική επεξεργασία | 100 |
| Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα - Συζήτηση | 102 |
| 3.1. Φυσικά βιοκτόνα από την αυτοφυή βιοποικιλότητα | 102 |
| 3.1.1. Χημική σύσταση | 102 |
| 3.1.1.1. Εποχιακή δακύμανση | 107 |
| 3.1.1.2. Μεθοδολογία παραλαβής αιθερίων αλαίων | 111 |
| 3.1.2. Βιοδραστικότητα | 111 |
| 3.1.2.1. Προνυμφοκτόνα | 112 |
| 3.1.2.2. Απωθητικά | 114 |
| 3.2. Φυσικά βιοκτόνα από την αγροτική βιοποικιλότητα | 117 |
| 3.2.1. Χημική σύσταση | 117 |
| 3.2.1.1. Βιομηχανικά αιθέρια έλαια | 117 |
| 3.2.1.2. Αιθέρια έλαια καρπών | 121 |
| 3.2.2. Βιοδραστικότητα | 123 |
| 3.2.2.1. Προνυμφοκτόνα | 123 |
| 3.2.2.2. Απωθητικά | 127 |
| 3.3. Φυσικά βιοκτόνα από τη διατροφική βιοποικιλότητα | 130 |
| 3.3.1. Χημική Σύσταση | 130 |
| 3.3.2. Βιοδραστικότητα | 133 |
| 3.3.2.1. Προνυμφοκτόνα | 133 |
| 3.3.2.2. Απωθητικά | 136 |
| Κεφάλαιο 4. Βιοδοκιμές Πεδίου | 139 |
| 4.1. Εισαγωγή | 139 |
| 4.2. Υλικά και Μέθοδοι | 140 |
| 4.2.1. Αιθέριο έλαιο δοκιμών πεδίου, χημικά και πρότυπα | 140 |
| 4.2.2. Προσδιορισμός της χημικής σύστασης του αιθερίου ελαίου ρίγανης | 140 |
| 4.2.3. Εκτροφή κουνουπιών και οργανισμών μη-στόχων | 141 |
| 4.2.4. Πειράματα δόσης-απόκρισης | 141 |

| | |
|--|------------|
| 4.2.5. Μελέτη τοξικότητας στους οργανισμούς μη-στόχους | 143 |
| 4.2.6. Παρασκευή γαλακτώματος | 143 |
| 4.2.7. Προσδιορισμός της απωθητικής δράσης σε εξωτερικούς χώρους | 144 |
| 4.2.8. Προσδιορισμός προνυμφοκτόνου και απωθητικής δράσης σε λεκάνες απορροής ομβρίων υδάτων | 145 |
| 4.2.9. Στατιστική επεξεργασία | 147 |
| 4.3. Αποτελέσματα – Συζήτηση | 148 |
| 4.3.1. Χημική σύσταση του αιθερίου ελαίου της ρίγανης | 148 |
| 4.3.2. Αύξηση κλίμακος βιοδοκιμών | 148 |
| 4.3.2.1. Μελέτη δόσης-απόκρισης | 148 |
| 4.3.2.2. Τοξικότητα σε οργανισμούς μη-στόχους | 150 |
| 4.3.3. Δοκιμές πεδίου | 151 |
| 4.3.3.1. Απωθητικά εξωτερικού χώρου | 151 |
| 4.3.3.2. Προνυμφοκτόνος και απωθητική δράση σε λεκάνες απορροής ομβρίων υδάτων | 152 |
| 4.4. Συμπεράσματα | 156 |
| Βιβλιογραφία | 157 |
| Παράρτημα | 188 |

Κεφάλαιο 1.

Εισαγωγή

1.1. Φυσικά προϊόντα

Σε μια εποχή κατά την οποία η “επιστροφή στη φύση” παρουσιάζεται ως η πλέον ελπιδοφόρα οδός για την επιβίωση του ανθρώπινου είδους, ο όρος «φυσικά προϊόντα» αποκτά ολοένα και μεγαλύτερη απήχηση. Ετυμολογικά, ο όρος περιλαμβάνει όλες τις χημικές ενώσεις -ανόργανες και οργανικές- που βρίσκονται στη φύση. Εντούτοις, έχει καθιερωθεί η έννοια αυτή να περιορίζεται στα μόρια που συνθέτουν τους ζώντες οργανισμούς ή παράγονται από αυτούς. Αυτά, διακρίνονται στα φυσικά προϊόντα του πρωτογενούς μεταβολισμού δηλαδή τα μόρια που συνιστούν τα θεμελιώδη λειτουργικά συστατικά όλων των ζώντων οργανισμών, όπως οι υδατάνθρακες, τα αμινοξέα, οι πρωτεΐνες, τα λίπη και τα νουκλεϊκά οξέα. Αντίστοιχα, ως φυσικά προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού χαρακτηρίζονται τα μόρια που δεν συμμετέχουν στις βασικές λειτουργίες των οργανισμών. Ο ρόλος των πρωτογενών μεταβολιτών έχει μελετηθεί διεξοδικά και είναι ίδιος σε όλους τους οργανισμούς. Αντίθετα, οι δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν διαφορετικό -και συνήθως αδιευκρίνιστο- ρόλο στους οργανισμούς στους οποίους εμπεριέχονται.

Σήμερα, με τον όρο φυσικά προϊόντα έχει πλέον επικρατήσει να χαρακτηρίζονται κυρίως τα μόρια του δευτερογενούς μεταβολισμού των οργανισμών του φυτικού ή/και ζωικού βασιλείου. Ωστόσο, το μεγαλύτερο μέρος των φυσικών προϊόντων προέρχεται από το φυτικό βασίλειο και, κυρίως, από τα ανώτερα φυτά (Ραγκούση-Ιγνατιάδου, 1996). Ένας τρόπος διαχωρισμού των φυσικών προϊόντων είναι σε πτητικά και μη πτητικά. Από την κατηγορία των πτητικών, τα αιθέρια έλαια αποτελούν έναν πολύ ιδιαίτερο τομέα, ο οποίος διαχρονικά έχει ευρύτατα μελετηθεί και βρίσκει ποικίλες εφαρμογές από την αρχαιότητα.

1.1.1. Αιθέρια έλαια

Τα αιθέρια έλαια αποτελούν φυσικά προϊόντα σύνθετης χημικής σύστασης με κύριο φυσικό τους χαρακτηριστικό την πτητικότητα. Πρόκειται για διαυγή και συνήθως άχρωμα υγρά μίγματα πτητικών οργανικών μορίων, με ελαιώδη εμφάνιση και ειδικό βάρος συνήθως μικρότερο του ύδατος. Παράγονται από τα αρωματικά φυτά, εκ των οποίων πολλά θεωρούνται και φαρμακευτικά, στα οποία προσδίδουν ένα ειδικό άρωμα, χαρακτηριστικό, εντός ορισμένων

ορίων, για το κάθε είδος ή την ποικιλία του φυτού (Σαρλής, 1994).

Τα αιθέρια έλαια απαντώνται σε μικρές συνήθως ποσότητες στους ελαιαδένες των αρωματικών φυτών, σε συγκεντρώσεις που σπάνια υπερβαίνουν το 1% (Bowles, 2003). Οι ελαιαδένες βρίσκονται σε όλα τα μέρη των φυτών, είναι εσωτερικοί ή εξωτερικοί. Όμως, η μεγαλύτερη ποσότητα των αιθερίων ελαίων βρίσκεται στα αυξητικά όργανα και μάλιστα των νεαρών φυτών (Sivropoulou et al., 1995). Κάθε αρωματικό φυτό παράγει ένα αιθέριο έλαιο που αποτελείται από μίγμα χημικών ενώσεων, οι οποίες έχουν ξεχωριστά αρώματα. Το άρωμα που τελικά χαρακτηρίζει το είδος ή την ποικιλία του φυτού, είναι η συνισταμένη των αρωμάτων των επιμέρους φυτοχημικών συστατικών και αναλογίας τους στο αιθέριο έλαιο (Σαρλής, 1994).

Τα αρωματικά έλαια μπορεί να περιέχουν έως και 150 συστατικά, σε αρκετά διαφορετικές συγκεντρώσεις. Όμως, συνήθως χαρακτηρίζονται από τα 2-3 κύρια συστατικά, τα οποία ενίοτε αποτελούν έως και το 85% του αιθερίου ελαίου, ενώ τα υπόλοιπα συστατικά συνήθως απαντώνται σε μικρές συγκεντρώσεις ή ίχνη (Burt, 2004). Τα φυτοχημικά συστατικά των αιθερίων ελαίων προσδιορίζουν και τις βιοδραστικότητές τους, οι οποίες τις τελευταίες δεκαετίες έχουν προσελκύσει σε μεγάλο βαθμό το ερευνητικό ενδιαφέρον και συμβάλλουν στην ολοένα αυξανόμενη εμπορική τους αξία.

Βιοσύνθεση αιθερίων ελαίων

Η βιοσύνθεση των αιθερίων ελαίων πραγματοποιείται μέσω μιας σειράς ενζυμικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα μέσα στους φυτικούς ιστούς έως τον τελικό σχηματισμό τους. Παρά τις αδιαμφισβήτητες προόδους που έχει σημειωθεί στη χημεία και βιοχημεία, η διεργασία της βιοσύνθεσης των αιθερίων ελαίων παραμένει εν πολλοίς αδιευκρίνιστη. Πάντως αποτελεί κοινή παραδοχή ότι τα διάφορα συστατικά σχηματίζονται κατά τον μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπών και των αμινοξέων, χρησιμοποιώντας ως πρόδρομη ουσία κάποιο από τα ενδιάμεσα προϊόντα του κύριου μεταβολισμού (Σκρουμπής, 1998).

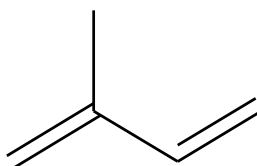
Με βάση τη βιοσυνθετική τους προέλευση, τα επιμέρους συστατικά των αιθερίων ελαίων υποδιαιρούνται σε δύο ευδιάκριτες ομάδες μορίων, τα τερπενοειδή και τα μη τερπενοειδή μόρια, τα οποία με τη σειρά τους είναι δυνατόν να είναι αλειφατικά ή αρωματικά.

Τερπενοειδή μόρια

Η χαρακτηριστική οσμή των αιθερίων ελαίων και η ελαιώδης τους σύσταση οφείλονται στο περιεχόμενό τους σε τερπενοειδή μόρια χαμηλού μοριακού βάρους, κυρίως μονοτερπένια, σεσκιτερπένια και σε μικρότερο βαθμό διτερπένια. Τα τερπενοειδή αποτελούν προϊόντα

χημικής τροποποίησης των τερπενίων, τα οποία έχουν υποστεί είτε οξείδωση (προσθήκη τουλάχιστον ενός ατόμου οξυγόνου) ή αναδιάταξη της ανθρακαλυσίδας τους. Τα τερπένια αποτελούν την πολυπληθέστερη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών που ανιχνεύονται στα αιθέρια έλαια. Είναι μικρά οργανικά μόρια με τεράστια ποικιλομορφία στη δομή τους που συντίθενται από δύο πρόδρομα μόρια το πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP) και το πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο (DMAPP), καθένα από τα οποία έχει πέντε άνθρακες (C-5). Δυο είναι τα πιθανά μονοπάτια για τη βιοσύνθεσή τους: ι) του μεβαλονικού οξέος, το οποίο χρησιμοποιεί ως πρόδρομο μόριο το ακετυλοσυνένζυμο Α και ιι) ένα ανεξάρτητο του μεβαλονικού οξέος μονοπάτι, στο οποίο χρησιμοποιούνται ως πρώτες ύλες το πυροφωσφορικό οξύ (Pyr) και η 3-φωσφορική γλυκεριναλδεϋδη (G3P) (Hunter, 2007).

Παρά τη δομική τους ποικιλομορφία, τα τερπένια σχετίζονται μεταξύ τους με τον κανόνα του ισοπρενίου, ο οποίος προτάθηκε το 1953 από τον Leopold Ruzicka. Σύμφωνα με αυτόν, τα τερπένια, θεωρείται ότι προέρχονται από τη συνένωση κεφαλής-ουράς διαφόρων μονάδων ισοπρενίου (2-μεθυλο-1,3-βουταδιένιο) (Σχήμα 1). Η ταξινόμησή τους πραγματοποιείται με βάση τον αριθμό των ισοπρενικών μονάδων που περιέχουν, όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.



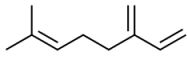
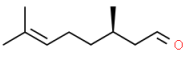
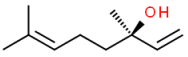
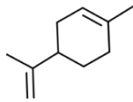
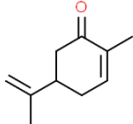
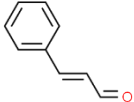
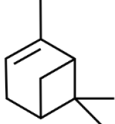
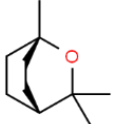
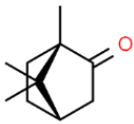
Σχήμα 1.1. Μονάδα ισοπρενίου

Πίνακας 1.1.1. Ταξινόμηση τερπενίων με βάση τον αριθμό ισοπρενικών μονάδων

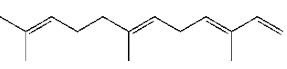
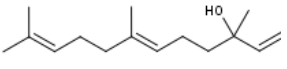
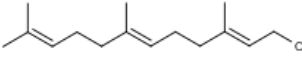
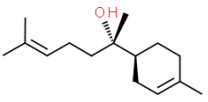
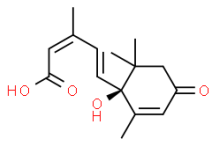
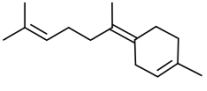
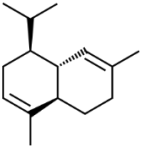
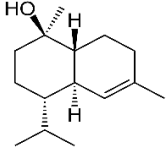
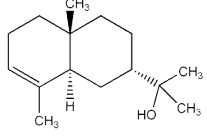
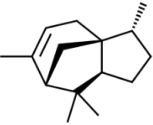
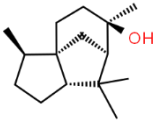
| Άτομα άνθρακα | Μονάδες ισοπρενίου | Ταξινόμηση |
|---------------|--------------------|----------------|
| 10 | 2 | Μονοτερπένια |
| 15 | 3 | Σεσκιτερπένια |
| 20 | 4 | Διτερπένια |
| 25 | 5 | Σεστερτερπένια |
| 30 | 6 | Τριτερπένια |
| 40 | 8 | Τετρατερπένια |
| >40 | | Πολυτερπένια |

Τα **μονοτερπένια** είναι η κυριότερη ομάδα μορίων που υπάρχουν στα αιθέρια έλαια και ορισμένες φορές αποτελούν έως το 90% της συνολικής σύστασής τους. Λόγω του μικρού τους μοριακού βάρους είναι ιδιαίτερα πτητικά και από τις πρώτες ουσίες που παραλαμβάνονται

κατά τη διαδικασία της απόσταξης. Τα μονοτερπένια αποτελούνται από δύο μονάδες ισοπρενίου και -ανάλογα με τη δομή της ανθρακικής τους αλυσίδας- διακρίνονται σε ακυκλικά, μονοκυκλικά και δικυκλικά (Devon and Scott, 1972). Τα μονοτερπένια που απαντώνται στα αιθέρια έλαια μπορεί να είναι υδρογονάνθρακες (α -πινένιο, λεμονένιο), αλκοόλες (μενθόλη, γερανιόλη, λιναλοόλη), αλδεΐδες (κινναμαλδεΐδη, κουμινάλδεΐδη), κετόνες (θυγιόνη), αιθέρες (ευκαλυπτόλη) και λακτόνες (νεπεταλακτόνη) (Regnault-Roger et al., 2012). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αιθερίων ελαίων που αποτελούνται κατά κύριο λόγο από μονοτερπένια είναι αυτά του γένους *Pinus*, με κύρια συστατικά τα α -πινένιο και β -πινένιο και των εσπεριδοειδών με κύριο συστατικό το λεμονένιο.

| ΑΚΥΚΛΑ ΜΟΝΟΤΕΡΠΕΝΙΑ | | |
|---|---|---|
|  |  |  |
| μυρκένιο | κιτρονελάλη | λιναλοόλη |
| ΜΟΝΟΚΥΚΛΙΚΑ ΜΟΝΟΤΕΡΠΕΝΙΑ | | |
|  |  |  |
| λεμονένιο | καρβόνη | κινναμαλδεΐδη |
| ΔΙΚΥΚΛΙΚΑ ΜΟΝΟΤΕΡΠΕΝΙΑ | | |
|  |  |  |
| α -πινένιο | ευκαλυπτόλη | καμφορά |

Σχήμα 1.2. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα ενώσεων των διαφόρων κλάσεων μονοτερπενίων.

| ΑΚΥΚΛΑ ΣΕΣΚΙΤΕΡΠΕΝΙΑ | | |
|---|---|---|
|  |  |  |
| α-φαρνεσένιο | νερολιδόλη | φαρνεσόλη |
| ΜΟΝΟΚΥΚΛΙΚΑ ΣΕΣΚΙΤΕΡΠΕΝΙΑ | | |
|  |  |  |
| α-μπιζαμπολόλη | αμπισικό οξύ | γ-μπιζαμπολένιο |
| ΔΙΚΥΚΛΙΚΑ ΣΕΣΚΙΤΕΡΠΕΝΙΑ | | |
|  |  |  |
| α-καδινένιο | α-καδινόλη | α-ευδεσμόλη |
| ΤΡΙΚΥΚΛΙΚΑ ΣΕΣΚΙΤΕΡΠΕΝΙΑ | | |
|  |  | |
| κεδρένιο | κεδρόλη | |

Σχήμα 1.3. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα ενώσεων των διαφόρων κλάσεων σεσκιτερπενίων.

Τα **σεσκιτερπένια** συνυπάρχουν στα αιθέρια έλαια μαζί με τα μονοτερπένια, παρ' ότι εμφανίζουν υψηλότερα σημεία τήξης. Κατά τη διάρκεια της απόσταξης, πολλά μονοτερπένια και άλλα ασταθή μόρια, όπως οι σεσκιτερπενικές λακτόνες, μεταλλάσσονται σε σεσκιτερπένια. Έτσι, το ποσοστό τους στην τελική σύσταση του αιθερίου ελαίου εξαρτάται από τη διάρκεια της απόσταξης. Τα σεσκιτερπένια είναι σταθερά μόρια και, σε αντίθεση με τα μονοτερπένια,

δεν κινδυνεύουν από τις υψηλές θερμοκρασίες της απόσταξης, η οποία αποτελεί και την καλύτερη μέθοδο παραλαβής τους. Δομικά, αποτελούνται από τρεις μονάδες ισοπρενίου και διακρίνονται σε ακυκλικά, μονοκυκλικά, δικυκλικά και τρικυκλικά (Devon and Scott, 1972). Τα σесκιτερπένια των αιθερίων ελαίων είναι καρβίδια (β-καρυοφυλλένιο, κουρκουμίνες), αλκοόλες (κεδρόλη, φαρνεσόλη), κετόνες (γερμακρόνη, τουμερόνες), εποξείδια (οξείδιο του καρυοφυλλενίου) κλπ (Bakkali et al. 2008).

Μη τερπενοειδή μόρια

Η κυριότερη ομάδα των μη τερπενοειδών μορίων που απαντάται σε μικρότερο ποσοστό στα αιθέρια έλαια είναι οι αρωματικές ενώσεις της ομάδας του φαινυλοπροπανίου. Τα μόρια αυτά συνίστανται από ένα βενζολικό δακτύλιο, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με μια πλευρική προπανική αλυσίδα. Το πλέον κοινό πρόδρομο μόριο των ενώσεων αυτών είναι το κινναμωμικό οξύ, ένα προϊόν της βιοσυνθετικής οδού του σικιμικού οξέος. Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει αλδεΐδες (κινναμαλδεΐδη), φαινόλες (ευγενόλη), μεθοξυ-παράγωγα (ελεμκίνη), μεθυλοδιοξυ-παράγωγα (μυριστικήνη) κλπ. Τυπικά μέλη της ομάδας είναι η ανηθόλη και η εστραγκόλη που απαντώνται σε πολλά αιθέρια έλαια των οικογενειών Apiaceae και Rutaceae.

Χαρακτηριστικοί δευτερογενείς μεταβολίτες ορισμένων φυτών είναι και μόρια που περιέχουν άζωτο ή θείο. Παρ' ότι αυτά απαντώνται σε μικρές συγκεντρώσεις, εντούτοις είναι υπεύθυνα για την χαρακτηριστική γεύση-οσμή των αιθερίων ελαίων στα οποία εμπεριέχονται (Bakkali et al., 2008).

Ο ρόλος των αιθερίων ελαίων στα φυτά

Για το ρόλο και τη σημασία της παρουσίας των αιθερίων ελαίων στα φυτά υπάρχει μια πλειάδα υποθέσεων. Ωστόσο, από φυσιολογική άποψη, δεν είναι ακόμα εφικτό να δοθεί μια τελική και αποδεκτή από όλους, εξήγηση σχετικά με τη χρησιμότητα και το ρόλο που διαδραματίζουν μέσα στους φυτικούς οργανισμούς (Σαρλής, 1994). Οι σπουδαιότερες από τις λειτουργίες οι οποίες έχουν κατά καιρούς αποδοθεί στα αιθέρια έλαια συνοψίζονται στις παρακάτω δράσεις:

- Απωθητική ή/και τοξική έναντι διαφόρων εντόμων-εχθρών ή παθογόνων.
- Προσελκυστική για διάφορα έντομα-επικονιαστές, γεγονός που συμβάλλει στην γονιμοποίηση των σταυρογονιμοποιούμενων, εντομόφιλων φυτών.
- Προστατευτική για τα φυτά από υψηλές θερμοκρασίες και ξηρασία, λόγω της εύκολης εξάτμισής τους και της συμμετοχής τους στην ελάττωση της διαπνοής .

- Προστατευτική για τα φυτά από το ψύχος, λόγω σχηματισμού προστατευτικού νέφους γύρω τους.
- Καταλυτική στον μεταβολισμό των γλυκοζιτών και άλλων ουσιών.
- Ορμονική δράση σε διάφορες λειτουργίες των φυτών.

Παραλαβή των αιθερίων ελαίων

Σήμερα, υπάρχουν αρκετές μέθοδοι παραλαβής των αιθερίων ελαίων από τα αρωματικά φυτά. Η επιλογή της πλέον κατάλληλης εξαρτάται κυρίως από το είδος και το τμήμα του φυτού, την περιεκτικότητά του σε αιθέριο έλαιο, την επιθυμητή ποιότητά του, τη χημική σύνθεση των συστατικών του και από διάφορους άλλους παράγοντες που σχετίζονται με την οικονομικότητα της παραγωγής (Σαρλής, 1994). Παρακάτω αναφέρονται οι κυριότερες μέθοδοι παραλαβής των αιθερίων ελαίων που χρησιμοποιούνται σήμερα:

Απόσταξη

Αποτελεί την πλέον διαδεδομένη και οικονομική μέθοδο παραλαβής των αιθερίων ελαίων. Πρόκειται για μια απλή μέθοδο, η οποία βασίζεται στη διαφορά στις τάσεις ατμών των συστατικών του διαλύματος. Η απόσταξη, ανάλογα με τον τρόπο που γίνεται, διακρίνεται σε:

- Υδρο-απόσταξη ή απόσταξη με νερό (Hydro-Distillation, HD),
- Υδρο-ατμο-απόσταξη ή απόσταξη με νερό και ατμό (Water-Steam Distillation, HSD),
- Απόσταξη με υδρατμούς (Steam-Distillation, SD),
- Μικρο-απόσταξη με υδρατμούς, εκχύλιση με οργανικό διαλύτη (Micro-Steam Distillation Extraction, MSDE),
- Απόσταξη υπό κενό (Vacuum Head Space Distillation, VHSD),
- Απομόνωση από το φυτό (Head Space, HD).

Εκχύλιση

Η μέθοδος της εκχύλισης χρησιμοποιείται κυρίως για την παραλαβή του αιθερίου ελαίου από φυτικά υλικά που είναι ευπαθή στην απόσταξη, όπως τα άνθη και τα φύλλα. Με την εκχύλιση παραλαμβάνονται τα λιπόφιλα πτητικά και μη πτητικά συστατικά του φυτού. Η διαδικασία της εκχύλισης, ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο εκχυλιστικό μέσο, διακρίνεται σε:

- Εκχύλιση με πτητικούς διαλύτες,

- Εκχύλιση με απορρόφηση σε λίπος,
- Εκχύλιση με υδρόφιλους διαλύτες,
- Εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά (Super Critical Liquids, SCL),
- Εκχύλιση με υδροφθοράνθρακες (Phytonic extraction).

Μηχανική Παραλαβή

Η μηχανική παραλαβή είναι μια βιομηχανική μέθοδος που εφαρμόζεται για την παραλαβή αιθερίων ελαίων, κυρίως από ξηρούς καρπούς ή φλοιούς εσπεριδοειδών. Συνήθως, εφαρμόζεται η τεχνική της κρυο-συμπίεσης του φυτικού υλικού. Τα μηχανήματα για ξηρούς καρπούς είναι πιεστήρια που προσομοιάζουν με αυτά των ελαιοτριβείων, ενώ για τους φλοιούς των εσπεριδοειδών συνήθως τρυπούν τους φλοιούς κατά τη συμπίεσή τους για να απελευθερωθούν τα αιθέρια έλαια, τα οποία στη συνέχεια διαχωρίζονται και παραλαμβάνονται από το χυμό ή το στερεό υπόλειμμα.

Ποιοτικός έλεγχος των αιθερίων ελαίων

Η ταυτότητα και η ποιότητα ενός αιθερίου ελαίου αξιολογείται με βάση μια σειρά κρίσιμων παραμέτρων, οι οποίες δίνουν πολύτιμες πληροφορίες για τις ιδιότητές του. Για την πλήρη ανάλυση και χαρακτηρισμό ενός αιθερίου ελαίου, προσδιορίζονται οι παρακάτω παράμετροι:

1) *Βοτανική καθαρότητα και αυθεντικότητα του αιθερίου ελαίου.* Η συστηματική κατάταξη του φυτού από το οποίο παραλαμβάνεται το αιθέριο έλαιο είναι πρωταρχικής σημασίας. Εξίσου σημαντικό είναι να καταγραφεί ο τόπος προέλευσης του φυτού, η εποχή συγκομιδής του, ο βαθμός ωριμότητάς του την ημέρα της συγκομιδής και το φυτικό τμήμα που χρησιμοποιήθηκε για την παραλαβή του αιθερίου ελαίου.

2) *Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.* Χρώμα, άρωμα.

3) *Φυσικές ιδιότητες.* Ειδικό βάρος, δείκτης διάθλασης, οπτική στροφική ικανότητα, διαλυτότητα, σημείο ζέσεως.

4) *Χημική σύσταση.* Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των φυτοχημικών συστατικών του αιθερίου ελαίου αποτελεί το σπουδαιότερο παράγοντα που καθορίζει την ποιότητά του. Οι αναλυτικές τεχνικές εξελίχθηκαν μετά το μέσον του 20ου αιώνα, από το στάδιο της απλής χρωματογραφίας σε αυτό της Φασματογραφίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Schreier, 1984). Παράλληλα, οι νέες χρωματογραφικές μέθοδοι όπως η Αέρια Χρωματογραφία, οι Υγρές Χρωματογραφίες Υψηλής και Μέσης Πίεσης και η Χειρόμορφη

Χρωματογραφία (Marriott et al., 2001) συνδυάστηκαν με τη Φασματομετρία Μαζών και τον Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό (Breitmaier, 2006) προσφέροντας σημαντικά όπλα για την απόδοση της δομής των συστατικών των αιθερίων ελαίων, αυξάνοντας κάθετα τη σχετική γνώση κατά τα τελευταία 40 χρόνια. Σήμερα, η πλέον διαδεδομένη μέθοδος ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού των συστατικών των αιθερίων ελαίων είναι η Αέρια Χρωματογραφία συνδυασμένη με τη Φασματομετρία Μαζών.

1.1.2. Η Χημειοποικιλότητα των αιθερίων ελαίων

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα αιθέρια έλαια αποτελούν σύνθετα μίγματα πτητικών οργανικών μορίων που παράγονται από τα αρωματικά φυτά, προσδίδοντας σε αυτά κάποιο ειδικό άρωμα, χαρακτηριστικό, εντός ορισμένων ορίων, για το κάθε είδος ή την ποικιλία του φυτού (Σαρλής, 1994). Από τον ορισμό αυτό, γίνεται κατανοητό, ότι η χημική ποικιλότητα των αιθερίων ελαίων είναι άμεσα συνδεδεμένη με την βιοποικιλότητα των αρωματικών φυτών από τα οποία έχουν παραληφθεί, ενώ υπάρχουν και ορισμένοι άλλοι παράγοντες που καθορίζουν τα στενά ή ευρεία όρια της ομοιογένειάς τους μέσα σε κάθε είδος ή ποικιλία του φυτού.

Η συνολική παγκόσμια βιοποικιλότητα των αρωματικών φυτών έχει εκτιμηθεί σε 17.500 taxa, σχεδόν το 5% περίπου της φυτικής βιοποικιλότητας (Lawrencet, 2000). Τα αρωματικά φυτά κατανέμονται παγκοσμίως σε περισσότερες από 50 Οικογένειες, ανάμεσα στις οποίες, ξεχωρίζουν για την ιδιαίτερα πλούσια βιοποικιλότητα τους στον ελλαδικό χώρο οι Οικογένειες Apiaceae (=Umbelliferae), Lamiaceae (=Labiatae) και Asteraceae (=Compositae).

Ωστόσο, από τα αρωματικά φυτά έχουν απομονωθεί έως σήμερα μόλις 3.000 αιθέρια έλαια, περίπου το 17% περίπου του συνόλου των αρωματικών φυτών της υφελίου, από τα οποία τα 300 έχουν σημαντική εμπορική αξία (Properzi et al., 2013). Αυτά παράγονται κατά 50% από καλλιεργούμενα φυτά και κατά 50% από άγριους πληθυσμούς (Lawrencet, 2000). Βάσει των αριθμών αυτών, γίνεται κατανοητή η σύνδεση των αιθερίων ελαίων με τη γεωργία, η οποία λειτουργεί ως έναυσμα για τη διενέργεια σχετικής έρευνας, αφενός για τη διερεύνηση νέων χρήσεων για τα γνωστά αιθέρια έλαια, και αφετέρου για τη μελέτη επιπλέον αιθερίων ελαίων με στόχο τον προσδιορισμό των ιδιοτήτων τους ή/και την αναγνώριση νέων σοδειών.

Ωστόσο, η χημική ταυτότητα των αρωματικών φυτών, αυτοφυών ή καλλιεργούμενων, προσδιορίζεται όχι μόνο από γενετικούς παράγοντες, αλλά και από ένα σύνολο επιπλέον παραγόντων που συνεισφέρουν στην ταξινομική και χημική πολυπλοκότητα των αρωματικών φυτών. Τόσο η συνολική περιεκτικότητα των φυτών σε αιθέρια έλαια, όσο και η ποιοτική και ποσοτική σύνθεση των αιθερίων ελαίων συχνά ποικίλουν μεταξύ των μελών ενός γένους, των

πληθυσμών ενός είδους, ή ακόμη και μεταξύ των ατόμων ενός τοπικού πληθυσμού. Μερικοί από τους κυριότερους παράγοντες που επηρεάζουν την ποικιλότητα αυτή στα αυτοφυή και τα καλλιεργούμενα αρωματικά φυτά, είναι οι εξής:

- *Το μέρος του φυτού που χρησιμοποιείται:* Στις περισσότερες περιπτώσεις η σύσταση του αιθερίου ελαίου εξαρτάται από το μέρος του φυτού από το οποίο προέρχεται: άνθη, πράσινα μέρη (φύλλα, βλαστοί), φλοιοί, ολόκληροι καρποί, περικάρπιο ή μόνο σπόροι, ρίζες κλπ. Η συγκέντρωση των τερπενοειδών είναι γενικά μεγαλύτερη στα αναπαραγωγικά όργανα, και κυρίως κατά την περίοδο πριν και τη διάρκεια της άνθησης. Επίσης, εξαιτίας του προστατευτικού ρόλου που παρέχουν στο φυτό έναντι των φυσικών εχθρών, η συγκέντρωσή τους είναι αυξημένη στα νεαρά όργανα σε σύγκριση με τα ώριμα. Οι διαφορές στη σύσταση του αιθερίου ελαίου στα διάφορα μέρη του φυτού μπορεί να αποδοθεί στην ετερογενή κατανομή των εκκριτικών οργάνων (τριχίδια, πόροι) στο φυτό. Συχνά από τα όργανα αυτά δεν εκκρίνονται τα ίδια συστατικά, ενώ και ο μηχανισμός έκκρισης μπορεί να είναι διαφορετικός ή να μην αναπτύσσονται ταυτόχρονα σε όλα τα μέρη του φυτού. Τέλος, το είδος και η θέση των οργάνων αυτών είναι χαρακτηριστικά για κάθε οικογένεια.

- *Το στάδιο ανάπτυξης των οργάνων του φυτού:* Το στάδιο ανάπτυξης των διαφόρων οργάνων του φυτού (φύλλα, άνθη, καρποί) είναι καθοριστικός παράγοντας τόσο για την συνολική απόδοση του φυτού σε αιθέριο έλαιο όσο και για την ποσοτική και ποιοτική σύστασή του. Στις περισσότερες περιπτώσεις η απόδοση σε αιθέριο έλαιο είναι αυξημένη κατά την περίοδο της ανθοφορίας. Ταυτόχρονα, η αναλογία ορισμένων συστατικών αυξάνεται από το 10%, που μπορεί να βρισκόταν στα αρχικά στάδια, έως το 50-70% κατά το στάδιο της πλήρους άνθησης. Σύμφωνα με τους Manez et al. (1991), οι αλλαγές που παρατηρούνται στη σύσταση των πτητικών συστατικών κατά την ωρίμανση των οργάνων οφείλονται στις αντιδράσεις κυκλοποίησης και αφυδάτωσης των συστατικών τους.

- *Η εποχή συλλογής (εποχιακή παραλλακτικότητα):* Σε πολλά είδη η ποσότητα και η σύσταση του εμπεριεχομένου αιθερίου ελαίου τους μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια του έτους, γεγονός που καθορίζει και την εποχή συλλογής του φυτού. Έτσι, ανάλογα με την εποχή παρατηρούνται αλλαγές στην ταυτότητα του κύριου συστατικού ή ακόμη και της κύριας ομάδας συστατικών. Συχνά οι μεταβολές στη σύσταση αλλά και την απόδοση σε αιθέριο έλαιο συνδέονται με τις καιρικές συνθήκες που επικρατούν τους διάφορους μήνες του έτους (διάρκεια ηλιοφάνειας, θερμοκρασία, υγρασία) ή ακόμη και με επιμολύνσεις από παθογόνους μικροοργανισμούς (ιδιαίτερα κατά τους μήνες με υψηλή βροχόπτωση). Σε κάθε περίπτωση η εποχή συλλογής επιλέγεται επί τη βάση του επιθυμητού συνδυασμού σύστασης και απόδοσης σε αιθέριο έλαιο.

- *Η γεωγραφία και το κλίμα (γεωγραφική - κλιματική ποικιλότητα)*: Ο μεγάλος βαθμός ποικιλότητας των αυτοφυών πληθυσμών των αρωματικών φυτών, ανάλογα με την περιοχή εξάπλωσής τους και τις τοπικές εδαφοκλιματικές συνθήκες, οδηγεί σε αξιοσημείωτη ποικιλότητα στην περιεκτικότητα των συστατικών των αιθερίων ελαίων για κάποια είδη φυτών (π.χ. *Thymus vulgaris*), λόγω της ποικιλίας των χημειοτύπων τους. Η ύπαρξη χημειοτύπων θεωρείται ότι είναι το αποτέλεσμα διαφορών στις περιβαλλοντικές συνθήκες, οι οποίες οδηγούν σε επιγενετικές διαφοροποιήσεις των ειδών. Επίσης, η απόδοση και σύσταση των αιθερίου ελαίων των καλλιεργούμενων αρωματικών φυτών εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από τη γεωγραφική θέση και τις συνθήκες της καλλιέργειας. Έτσι, παράγοντες όπως το γεωγραφικό ύψος, η ηλιοφάνεια, ο τύπος του εδάφους, η υγρασία και η βροχόπτωση θα πρέπει να προσδιορίζουν την πλέον κατάλληλη τοποθεσία καλλιέργειας ενός είδους για την παραγωγή αιθερίου ελαίου με τον επιθυμητό συνδυασμό σύστασης και απόδοσης.

Η κατανόηση της χημειοποικιλότητας των αιθερίων ελαίων και της ταξινομικής και χημικής πολυπλοκότητας των αρωματικών φυτών, αναδεικνύει την πολύτιμη αξία των «άγριων» γενετικών πόρων -ένα βιολογικό είδος είναι περισσότερα του ενός «χημικά είδη»- και διαμορφώνει ένα σαφές ερευνητικό πλαίσιο για τη διατήρηση και αξιοποίησή τους.

1.1.3. Εφαρμογές αιθερίων ελαίων

Τα αιθέρια έλαια αξιοποιήθηκαν από τα πρώτα κιόλας βήματα του σύγχρονου πολιτισμού, ανταποκρινόμενα σε πολλές και διαφορετικές ανάγκες της ανθρώπινης φύσης. Οι τοιχογραφίες στα σπήλαια του Lascaux της Γαλλίας πιστοποιούν τη χρήση αρωματικών φυτών από τον προϊστορικό άνθρωπο από το 18.000 π.Χ. Παρ' ότι υπάρχουν γραπτές περιγραφές της χρήσης των αρωματικών φυτών ως αρτύματα και μπαχαρικά από τη 2η χιλιετία π.Χ. στην αρχαία Ελλάδα (Bauer et al., 2001), η απόσταξη ως μέθοδος παρασκευής αιθερίων ελαίων πιστεύεται ότι ανακαλύφθηκε στην Ανατολή (Αίγυπτο, Ινδία και Περσία) (Guenther, 1948) περίπου πριν από 3.000 χρόνια και βελτιώθηκε από τους Άραβες κατά τον 9ο μ.Χ. αιώνα (Bauer et al., 2001).

Οι αρχαίοι Αιγύπτιοι υπήρξαν αριστοτέχνες στη χρήση των αιθερίων ελαίων, τα οποία χρησιμοποιούσαν σε πολλούς και διαφορετικούς τομείς της καθημερινής τους ζωής όπως η ιατρική, η κοσμετολογία, η αρωματοποιία και η θρησκεία. Τα αρωματικά έλαια τους συνόδευαν από τη γέννηση έως και το θάνατο, γεγονός που υποδεικνύει την ιερή σημασία τους για τον αρχαίο Αιγυπτιακό πολιτισμό. Την ίδια εποχή, στην αρχαία Κίνα έγιναν οι πρώτες καταγραφές για τις φαρμακευτικές ιδιότητες και χρήσεις των αρωματικών ελαίων στο βιβλίο του Κίτρινου Αυτοκράτορα Χουάνγκ Ντι (2697-2597 π.Χ.) «Η κλασική ιατρική του Κίτρινου

Αυτοκράτορα». Στη γηραιά ήπειρο, οι αρχαίοι Έλληνες ήσαν οι πρώτοι που ανακάλυψαν τις ιδιότητες των αρωματικών φυτών και των ελαίων τους. Από τη Μινωική και Μυκηναϊκή εποχή ήταν ήδη γνωστή η εξαγωγή αρωμάτων από τα φυτά με εμποτισμό σε λίπος και έκθλιψη–στύψη (Λιβέρης 1997). Πρώτος ο Ιπποκράτης (460-377 π.Χ.) άνοιξε έναν ολοκληρωμένο δρόμο για τη χρήση των αιθερίων ελαίων στην καθημερινή σωματική φροντίδα, ενώ αναλυτικές περιγραφές για την παρασκευή και τις φαρμακευτικές χρήσεις τους δόθηκαν αργότερα από τους Διοσκουρίδη (1^{ος} αιώνας μ.Χ.) και Γαληνό (129-199 μ.Χ.).



Εικόνα 1.1. Αρωματικές προσφορές της Αυτής Μεγαλειότητος Νεφερτίτης, 13^{ος} αιώνας π.Χ., Αίγυπτος (*Giraudon*).

Σήμερα, μετά από χιλιάδες χρόνια εξέλιξης του ανθρώπινου πολιτισμού, τα αιθέρια έλαια συνεχίζουν να αποτελούν τη βάση για πολλά προϊόντα καθημερινής κατανάλωσης ή χρήσης. Αποτελούν τη βάση της αρωματοποιίας, υποστηρίζουν σε σημαντικό βαθμό τη βιομηχανία τροφίμων και συμμετέχουν σε μικρότερο βαθμό σε πολλούς και διαφορετικούς κλάδους της οικονομίας ως πηγές βιομηχανικών πρώτων υλών (Breitmaier, 2006). Οι θεραπευτικές τους ιδιότητες είναι πλέον επιστημονικά εξακριβωμένες, ενώ συνεχώς νέες χρήσεις των αιθερίων ελαίων βρίσκουν εφαρμογή κατά τα τελευταία έτη χάρη στην εξέλιξη των τεχνικών ανάλυσης, οι οποίες έχουν αυξήσει σημαντικά τη διαθέσιμη γνώση για τη χημική σύσταση και τις λειτουργικές τους ιδιότητες.

Οι κυριότερες σύγχρονες χρήσεις των αιθερίων ελαίων είναι στα τρόφιμα (ως αρωματικές ύλες), σε προϊόντα περιποίησης (αρώματα, καλλυντικά) και στα φάρμακα (για τις λειτουργικές τους ιδιότητες) (Burt, 2004). Η αξία των εφαρμογών τους στην αρωματοθεραπεία

αντιστοιχεί σε λίγο περισσότερο από το 2% της συνολικής αγοράς (Van de Braak and Leijten, 1999). Επίσης, μεμονωμένα συστατικά των αιθερίων ελαίων χρησιμοποιούνται ως αρωματικές ύλες για τα τρόφιμα, είτε απομονωμένα από το φυτικό υλικό ή ως συνθετικά παρασκευάσματα (Oosterhaven et al., 1995). Οι αντιβακτηριακές ιδιότητες των αιθερίων ελαίων και των συστατικών τους βρίσκουν εφαρμογές σε ένα μεγάλο εύρος καταναλωτικών προϊόντων, όπως για παράδειγμα στα προϊόντα χειρουργικής οδοντιατρικής (Manabe et al., 1987), στα αντισηπτικά (Bauer and Garbe, 1985; Cox et al., 2000), τα συμπληρώματα διατροφής για θηλάζουσες χοιρομητέρες και απογαλακτισμένα χοιρίδια (Van Krimpen and Binnendijk, 2001; Pilsley et al., 2002) κλπ. Ορισμένα συντηρητικά και πρόσθετα τροφίμων που περιέχουν αιθέρια έλαια έχουν αναγνωριστεί ως ασφαλή και είναι πλέον εμπορικά διαθέσιμα τόσο στην Ευρώπη, όσο και τις Ηνωμένες Πολιτείες (Burt, 2004). Άλλες βιολογικές δράσεις των αιθερίων ελαίων βρίσκουν εφαρμογές σε ένα σύνολο διαφορετικών εμπορικών προϊόντων όπως ανασχετικά βλάστησης της πατάτας (Hartmans et al., 1995) και εντομοαπωθητικά σκευάσματα (Carson and Riley, 1993).

1.2. Το πρόβλημα των κουνουπιών

Τα κουνούπια αποτελούν αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας παγκοσμίως, εξαιτίας της υγειονομικής τους σημασίας ως διαβιβαστές μιας μεγάλης ποικιλίας ιογενών και άλλων παρασιτικών ασθενειών που προσβάλλουν τον άνθρωπο και τα ζώα. Περισσότερο από το μισό του ανθρώπινου πληθυσμού της γης διαβιεί σε περιοχές στις οποίες ελλοχεύει ο κίνδυνος να «τσιμπηθεί» από κουνούπια μολυσμένα με παθογόνα ή παράσιτα που είναι δυνατόν να μεταδώσουν ασθένειες όπως η ελονοσία, ο δάγκειος πυρετός, ο πυρετός Chikungunya, ο ιός του Δυτικού Νείλου, ο ιός της Ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας και οι φιλαριάσεις. Παρόλο που τα 3/4 περίπου όλων των ειδών κουνουπιών απαντώνται σε υγρές τροπικές και υποτροπικές χώρες, τα κουνούπια είναι παράγοντες όχλησης και αποτελούν δυνητικούς διαβιβαστές παθογόνων για τον άνθρωπο και στις εύκρατες περιοχές (Becker et al., 2010). Έτσι, τα κουνούπια αποτελούν παγκοσμίως μια πολύ σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία και η παρουσία τους σε μία περιοχή επιφέρει πολλές δυσμενείς επιπτώσεις στην ποιότητα ζωής, στις εργασίες υπαίθρου και στον τουρισμό, ενώ, επιδρά αρνητικά και στην οικονομική ανάπτυξη της περιοχής.

1.2.1. Γενικά περί κουνουπιών

Ταξινόμηση και γεωγραφική διασπορά των κουνουπιών

Τα κουνούπια ανήκουν στην Οικογένεια των Culicidae, την Τάξη των Διπτέρων (Diptera) και την Υπόταξη των Νηματόκερων (Nematocera), και αριθμούν περίπου 3.500 είδη παγκοσμίως. Έως το 1998, τα είδη της οικογένειας Culicidae ταξινομούνταν σε τρεις υποοικογένειες και 38 γένη: την Anophelinae με τρία γένη, την Culicinae με 34 γένη και την Toxorhynchitinae με ένα μόνο γένος. Φυλογενετική μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Harbach και Kitching το 1998, απέδειξε ότι τα κουνούπια του γένους *Toxorhynchites* δεν αποτελούν ξεχωριστή υποοικογένεια, αλλά ομάδα της υποοικογένειας *Culicinae*. Τα κουνούπια της υποοικογένειας Anophelinae αναφέρονται ως «ανωφελή» και ορισμένα μέλη της έχουν τη δυνατότητα να μολύνονται από ένα ή περισσότερα είδη των πλασμοδίων της ελονοσίας, μεταδίδοντας τη νόσο στον άνθρωπο. Αντίθετα, τα κουνούπια της υποοικογένειας των *Culicinae* που αναφέρονται ως «κοινά», δεν μπορούν να μολυνθούν με τα πλασμοδία της ελονοσίας του ανθρώπου (Σαμανίδου - Βογιατζόγλου 2011). Η συντριπτική πλειοψηφία των κουνουπιών ανήκει στην υποοικογένεια *Culicinae* (περίπου 2.930 είδη), τα σπουδαιότερα γένη της οποίας είναι τα *Aedes*, *Culex*, *Ochlerotatus*, *Culiseta*, *Mansonia*, *Coquillettidia*, *Haemagogus*, *Sabethes* και *Psorophora* (Σαββοπούλου - Σουλτάνη et al., 2011).

Η εξάπλωση των κουνουπιών είναι κοσμοπολιτική, με τη μεγαλύτερη ποικιλία ειδών να έχει καταγραφεί στις τροπικές και εύκρατες περιοχές (Σαμανίδου-Βογιατζόγλου, 2011). Δεν υπάρχει σχεδόν καμία περιοχή του κόσμου που να μην μπορεί να αναπτυχθεί κάποιο από τα είδη κουνουπιών που έχουν έως σήμερα καταγραφεί (Μπέτζιος, 1989). Όμως, είδη κουνουπιών υπάρχουν ακόμη και στην αρκτική ζώνη όπου μια ορισμένη εποχή του έτους αναπτύσσονται σε υπερβολικά μεγάλους αριθμούς προκαλώντας αφόρητη ενόχληση. Επίσης, η παρουσία κουνουπιών έχει διαπιστωθεί ακόμα και σε υψόμετρο 4.300 μέτρων στο οροπέδιο του Κασμίρ, καθώς και σε βάθος 1.160 μέτρων υπό της επιφανείας της θαλάσσης, σε μεταλλεία χρυσού στη Δ. Ινδία. Η μόνη περιοχή της Γης στην οποία δεν έχει ακόμα ανιχνευτεί η παρουσία κουνουπιών είναι η Ανταρκτική, καθώς αυτή παραμένει συνεχώς καλυμμένη με πάγους (Σαμανίδου-Βογιατζόγλου, 2011).

Στοιχεία μορφολογίας και βιολογίας των κουνουπιών

Όπως όλα τα έντομα της Τάξης Δίπτερα (Diptera), έτσι και τα κουνούπια είναι «ολομετάβολα», δηλαδή υφίστανται πλήρη μεταμόρφωση. Ο κύκλος της ζωής τους ολοκληρώνεται στα παρακάτω τέσσερα διακριτά στάδια: ωού, προνύμφης, νύμφης και τέλειου. Μόνο στο στάδιο του τέλειου τα κουνούπια έχουν την ικανότητα να πετούν, ενώ στα ατελή στάδιά τους είναι υδρόβια (Σαμανίδου-Βογιατζόγλου, 2011). Επομένως, απαραίτητη προϋπόθεση για την εγκατάσταση κουνουπιών σε μια περιοχή είναι η ύπαρξη νερού, είτε

στάσιμου ή με μικρή ροή, όπου εναποθέτουν τα ωά τους και αναπτύσσονται κατά τα ατελή στάδια (προνύμφες και νύμφες) (Μπέτζιος, 1989). Τα διάφορα είδη των κουνουπιών έχουν αναπτύξει ειδικούς μηχανισμούς προσαρμογής, οι οποίοι τα καθιστούν ικανά να διαβιούν σε πολλά είδη βιοτόπων. Είναι σπάνιες οι περιπτώσεις στις οποίες υδάτινα σημεία δεν είναι κατάλληλα για την ανάπτυξη κουνουπιών (Σαμανίδου-Βογιατζόγλου 2011).

Τα **ωά** τους είναι μικρά, επιμήκη και συνήθως λευκά ή ανοιχτόχρωμα κατά την στιγμή της εναπόθεσης, ενώ αργότερα σε πολλές περιπτώσεις αλλάζουν χρώμα και γίνονται τεφρά ή μελανά. Η εναπόθεση των ωών γίνεται στην επιφάνεια του νερού, παρ' ότι δεν είναι σπάνιες οι περιπτώσεις εναπόθεσής τους σε λάσπη ή στο έδαφος (σε είδη του γένους *Aedes*), αλλά πάντα σε σημεία που θα κατακλυσθούν κάποια στιγμή από νερό, οπότε και πραγματοποιείται η εκκόλαψη των προνυμφών (Μπέτζιος 1989).

Ανεξάρτητα από τη θέση εναπόθεσης των ωών, οι **προνύμφες** είναι πάντα υδρόβιες. Το σχήμα τους είναι σκωληκόμορφο και χωρίζονται σε τρία ευδιάκριτα τμήματα: κεφαλή, θώρακα και κοιλία. Στο άνω μέρος του δου κοιλιακού τμήματος υπάρχουν δύο αναπνευστικά στίγματα με τα οποία η προνύμφη αναπνέει ανεβαίνοντας στην επιφάνεια του νερού (Μπέτζιος, 1989). Τα χαρακτηριστικά που ξεχωρίζουν τις προνύμφες των κουνουπιών από τις άλλες υδρόβιες προνύμφες εντόμων, είναι η έλλειψη ποδιών και στο γεγονός ότι ο σφαιροειδής τους θώρακας είναι πλατύτερος από το κεφάλι. Οι **νύμφες** μοιάζουν με κόμμα και ζουν μέσα στο νερό. Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμά τους είναι ότι κινούνται αρκετά ζωηρά (Μπέτζιος 1989).

Τα **τέλεια** έντομα είναι μικρά, μήκους 3 έως 6 χιλιοστών και σε ελάχιστα είδη το μήκος τους φτάνει έως τα εννέα χιλιοστά. Έχουν μεγάλους σύνθετους οφθαλμούς και οι κεραίες των αρσενικών είναι πτεροειδείς, ενώ των θηλυκών νηματοειδείς. Τα στοματικά μόρια είναι μυζητικού τύπου και έχουν μορφή μακριάς προβοσκίδας, στα πλάγια της οποίας βρίσκονται οι γναθικές προσακτρίδες. Οι πτέρυγες είναι λεπτές, διαφανείς και έχουν λέπια επάνω στα νεύρα και την επιφάνεια. Στην περιφέρεια των πτερύγων υπάρχουν επίσης τρίχες που σχηματίζουν τον «κροσσό». Τα χαρακτηριστικά που ξεχωρίζουν τα τέλεια των κουνουπιών από τα τέλεια των άλλων Διπτέρων, είναι ο συνδυασμός μεγάλης προβοσκίδας, λεπιών στα νεύρα των πτερύγων και η χαρακτηριστική διάταξη των νεύρων (Μπέτζιος 1989).

Μόνο τα **θηλυκά κουνούπια** είναι αιμομυζητικά. Το αίμα είναι απαραίτητο για την ωρίμανση των ωών και συνήθως προηγείται μια τουλάχιστον μύζηση αίματος (αιμοληψία) πριν από κάθε ωοτοκία (Μπέτζιος, 1989). Τα θηλυκά κουνούπια γεννούν 50-500 ωά, περίπου 2-4 ημέρες (ή περισσότερο σε ψυχρά εύκρατα κλίματα) μετά από την αιμοληψία (Becker et al., 2010). Κατά τη διάρκεια της μη αναπαραγωγικής περιόδου, είναι αρκετή, για την επιβίωσή τους, η απομύζηση σακχαρούχων φυτικών χυμών ή άλλων μελιτωδών εκκρίσεων, όπως και

στα αρσενικά. Στα λεγόμενα "αυτόγωνα" είδη, όπως το αστικό κουνούπι *Culex pipiens molestus* (L.), δεν είναι απαραίτητη η λήψη αίματος για την πρώτη ωοτοκία, αφού τα απαιτούμενα θρεπτικά συστατικά έχουν εξασφαλισθεί από το προνυμφικό στάδιο. Αντίστοιχα, "αναυτόγωνα" είναι τα είδη κουνουπιών που για την ανάπτυξη των ωών τους είναι απαραίτητη η κατανάλωση των πρωτεϊνών του αίματος. Η αναπαραγωγή του κουνουπιού γίνεται κατά τους θερμούς μήνες, περίοδο κατά την οποία εκδηλώνεται η δραστηριότητά τους με την αναζήτηση των ξενιστών προς λήψη αίματος (Μπέτζιος, 1989).

Ως «**Διάπαυση**» χαρακτηρίζεται στο βιολογικό κύκλο των κουνουπιών η περίοδος κατά την οποία αναστέλλεται η ανάπτυξη των ατελών σταδίων (ωό, προνύμφη, νύμφη) (Σαμανίδου - Βογιατζόγλου, 2011). Η διάπαυση είναι μια νευροορμονικώς ελεγχόμενη δυναμική κατάσταση χαμηλής μεταβολικής δραστηριότητας που σχετίζεται με μειωμένη μορφογένεση, αυξημένη αντοχή σε ακραίες τιμές δυσμενών περιβαλλοντικών συνθηκών, και με αλλαγή ή μείωση της δραστηριότητας που αφορά τη συμπεριφορά τους (Τζανακάκης, 1995). Η διάπαυση στα κουνούπια αποτελεί συνήθως προσαρμογή διαχείμασης και οι πρωταρχικοί παράγοντες, που επάγουν την έναρξη και τη λήξη της, είναι η διάρκεια της φωτοπεριόδου και η θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Η μείωση της διάρκειας της φωτοπεριόδου αποτελεί το ερέθισμα για την επαγωγή της διάπαυσης, ενώ αντίθετα η αύξηση της διάρκειας φωτοπεριόδου συνεπάγεται την ενεργοποίηση των μεταβολικών λειτουργιών και την ολοκλήρωση της διάπαυσης. Το ίδιο αποτέλεσμα μπορεί να έχει και η αύξηση της θερμοκρασίας μετά από μία μακρά περίοδο ψύχους (Σαμανίδου – Βογιατζόγλου, 2011). Το στάδιο της ανάπτυξης κατά το οποίο επάγεται η διάπαυση, εξαρτάται από το είδος. Κατά τη διάρκεια της διάπαυσης, ορισμένα είδη μπορεί να επιβιώνουν αποκλειστικά με τα θρεπτικά συστατικά που έχουν ήδη αποθηκεύσει στον λιπώδη ιστό τους, ενώ άλλα μπορεί να τρέφονται περιστασιακά με αίμα, χωρίς όμως να ολοκληρώνουν τη διαδικασία της ωογένεσης. Τα ακμαία αρσενικά, συνήθως, δεν εισέρχονται σε διάπαυση και δεν επιβιώνουν το χειμώνα, με εξαίρεση το αστικό είδος *Culex pipiens molestus*, το οποίο συνεχίζει την ανάπτυξή του και το χειμώνα, σε προφυλαγμένες υδάτινες συλλογές μέσα σε οικήματα.

1.2.2. Χωροκατακτητικά είδη κουνουπιών

Η ελεύθερη και αδιάκοπη διακίνηση των αγαθών και ανθρώπων μέσω του εμπορίου και των ταξιδιών, σε συνδυασμό με την κλιματική αλλαγή, έχουν διευκολύνει την εξάπλωση μη ιθαγενών ειδών (non-native species) σε πολλές περιοχές της υφελίου. Ως αποτέλεσμα, ένας σημαντικός αριθμός φυτών και ζώων έχει εισέλθει σε νέους βιότοπους αλλοιώνοντας τη φυσική χλωρίδα και πανίδα με άμεσες συνέπειες στο περιβάλλον και τον άνθρωπο. Οι οργανισμοί

αυτοί χαρακτηρίζονται ως «χωροκατακτητικά είδη» (invasive species). Η Ευρώπη τα τελευταία χρόνια έχει καταγράψει την «εισβολή» στην επικράτειά της περισσότερων από 11.000 ξένων ειδών.

Την πρώτη θέση ανάμεσα στα χωροκατακτητικά είδη καταλαμβάνουν τα έντομα. Ειδικότερα, από τα 1.522 εγκατεστημένα είδη, τα 1.306 (86%) είναι έντομα. Μεταξύ αυτών συμπεριλαμβάνονται αρκετά είδη κουνουπιών (Invasive Mosquito Species, IMS) που έχουν ήδη εισαχθεί στην ευρωπαϊκή επικράτεια, ενώ υπολογίζεται ότι λόγω των εντεινόμενων επιπτώσεων της κλιματικής αλλαγής, το πρόβλημα των χωροκατακτητικών κουνουπιών στο άμεσο μέλλον θα επιδεινωθεί. Μελλοντικά, αυτά αναμένεται να προκαλέσουν σημαντικά υγειονομικά και περιβαλλοντικά προβλήματα, αφού τα κουνούπια αποτελούν το βασικό φορέα παρασίτων και ιών που προκαλούν επικίνδυνες ασθένειες, οι οποίες στον αναπτυσσόμενο κόσμο είτε δεν προϋπήρχαν είτε είχαν πρακτικά εξαλειφθεί.

Το Ασιατικό κουνούπι τίγρης, *Aedes (Stegomyia) albopictus*, θεωρείται ως το πλέον χωροκατακτητικό είδος κουνουπιού παγκοσμίως και κατατάσσεται στη λίστα των 100 σημαντικότερων εισβαλόντων ειδών. Το κουνούπι αυτό έχει εξαπλωθεί κατά τα τελευταία 30-40 χρόνια από τη Νοτιανατολική Ασία στην Αμερική, σε περιοχές της Αφρικής, στη βόρεια Αυστραλία και σε διάφορες χώρες της Νότιας -κυρίως- Ευρώπης (Paupy et al., 2009). Ως κύριοι τρόποι διασποράς του θεωρείται το εμπόριο των χρησιμοποιημένων ελαστικών και του εισαγόμενου φυτού “lucky bamboo” (Medlock et al., 2012). Τα σημαντικότερα παθογόνα που μεταδίδει το Ασιατικό κουνούπι-τίγρης είναι ο ιός του Δάγκειου πυρετού (DFV), ο ιός Chikungunya (CHIKV) και οι νηματώδεις του γένους *Dirofilaria* που προκαλούν ασθένειες κυρίως στα σκυλιά γνωστές ως διροφιλαριώσεις.

Το είδος *Aedes (Stegomyia) aegypti* αποτελεί ένα ακόμα σημαντικό χωροκατακτητικό είδος κουνουπιού που δυνητικά μπορεί να επιφέρει δυσμενείς υγειονομικές επιπτώσεις στην Ευρώπη. Αποτελεί φορέα των ιών του κίτρινου πυρετού (YFV), του δάγκειου πυρετού (DENV), του δάγκειου αιμορραγικού πυρετού (DHF), του πυρετού Chikungunya (CHIKV) και του ιού Zika (Medlock et al., 2012). Απαντάται στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές της Αμερικής, Αφρικής και Ασίας, καθώς και τις νοτιοανατολικές ΗΠΑ, τα νησιά του Ινδικού Ωκεανού και τη Βόρεια Αυστραλία (Soumahoro et al., 2010). Το είδος αυτό ήταν εγκατεστημένο στην Ευρώπη έως τις αρχές του 20ου αιώνα και έχει πρόσφατα επανεγκατασταθεί στη Μαδέρα (Almeida et al., 2007) και γύρω από τη Μαύρη Θάλασσα, σε Νότια Ρωσία, Αμπχαζία και Γεωργία (Yunicheva et al., 2008). Το 2010 η παρουσία του καταγράφηκε για πρώτη φορά και στην Ολλανδία (Scholte et al., 2010). Στην περίπτωση που επανεισαχθεί στη Νότια Ευρώπη, δεν υπάρχουν κλιματικοί παράγοντες που να εμποδίσουν την

ευρεία εγκατάστασή του (Reiter, 2010). Έτσι, προκαλεί έντονο προβληματισμό για τις υγειονομικές αρχές, αφού η παρουσία του στην περιοχή κατά το παρελθόν είχε συνδεθεί με την εξάπλωση μεγάλων επιδημιών κίτρινου και δάγκειου πυρετού (Fontenille et al., 1997).

Ένα άλλο σημαντικό χωροκατακτητικό είδος παγκοσμίως αποτελεί το είδος *Aedes (Finlaya) japonicus*. Ξεκίνησε από την Ανατολική Ασία και την Άπω Ανατολή (Tanaka et al., 1979) και έχει πλέον ευρέως εγκατασταθεί στη Βόρεια Αμερική και τη Κεντρική Ευρώπη. Παρ' ότι δεν θεωρείται σημαντικός φορέας ασθενειών, η εξάπλωσή του σε αστικές περιοχές και η τάση του να τρέφεται από ένα ευρύ φάσμα ξενιστών, το καθιστούν ένα ιδιαίτερα οχληρό αιμομυζητικό παράσιτο. Ενώ σε εργαστηριακές μελέτες έχει αποδειχθεί ως ανταγωνιστικός φορέας ενός σημαντικού αριθμού ιών υψίστης υγειονομικής σημασίας, είναι ακόμα αδιευκρίνιστος ο ρόλος του στην εξάπλωση των ιών στο φυσικό περιβάλλον (Versteirt et al. 2009).

Ορισμένα επιπλέον είδη κουνουπιού που έχουν εισβάλλει σε νέους βιότοπους, συμπεριλαμβανομένης της Γηραιάς Ηπείρου είναι τα *Aedes (Ochlerotatus) atropalpus*, *Aedes (Protomacleaya) triseriatus*, *Aedes (Finlaya) koreicus* και *Culex (Culex) vishnui* (Medlock et al., 2012). Η εξάπλωση των ειδών αυτών έχει προς το παρόν περιοριστεί στις περιοχές όπου εισήχθησαν. Ωστόσο, η ευρύτερη εξάπλωσή τους αποτελεί μείζονα περιβαλλοντική απειλή με δυνητικά σημαντικές υγειονομικές, οικονομικές και κοινωνικές επιπτώσεις.

1.2.3. Το είδος *Aedes (Stegomyia) albopictus*

1.2.3.1. Βιο-οικολογία του *A. albopictus*

Το *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894 ή «Ασιατικό κουνούπι τίγρης» (Asian tiger mosquito) είναι είδος κουνουπιού που κατάγεται από τη Νοτιοανατολική Ασία. Τα τέλεια κουνούπια του είδους φέρουν λευκά λείψα, υπό μορφή λευκής γραμμής, στη ραχιαία πλευρά του θώρακα (Σαββοπούλου-Σουλτάνη κ.α. 2011), είναι σχετικά μικρά σε μέγεθος, ενώ κατά την αναγνώριση μπορεί εύκολα να γίνει σύγχυση με το συγγενές γένος-είδος *Aedes cretinus* που έχει καταγραφεί σε Ελλάδα και Τουρκία (ECDC, 2015). Το *Ae. albopictus* αναπτύσσει πολλές γενιές ανά έτος, τρεφόμενο κυρίως με ανθρώπινο αίμα, αλλά και με το αίμα άλλων θηλαστικών και πτηνών. Τα ωά του αντέχουν στην ξηρασία, ενώ οι προνύμφες του μπορούν να αναπτυχθούν ακόμα και σε μικρές υδάτινες εστίες, όπως δοχεία, κοιλότητες δένδρων ή ελαστικά οχημάτων. Τέλος, τα ενήλικα θηλυκά τσιμπούν κατά τη διάρκεια της ημέρας τους ξενιστές για λήψη αίματος (Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011).



Εικόνα 1.2. Τέλειο *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse 1895).

1.2.3.2. Εξάπλωση του *Ae. albopictus* στον κόσμο και τρόποι διασποράς

Το *Ae. albopictus*, το περισσότερο χωροκατακτητικό είδος κουνουπιού παγκοσμίως (Enserink, 2008) εμπεριέχεται στη λίστα των 100 σημαντικότερων εισβαλώντων ειδών, με βάση τις διαταραχές που προκαλούν στη βιοποικιλότητα των νέων περιοχών εισβολής και των επιπτώσεων που προκαλούν στην υγεία του ανθρώπου (I.S.S.G. 2011). Από τη Νοτιανατολική Ασία, όπου και ενδημούσε στο παρελθόν, τα τελευταία 30-40 χρόνια έχει εξαπλωθεί σε Βόρεια, Κεντρική και Νότια Αμερική, σε περιοχές της Αφρικής, στη Βόρεια Αυστραλία και σε διάφορες χώρες της Ευρώπης (Benedict et al., 2007; Enserink, 2008; Paupy et al., 2009).

Στην Ευρώπη εντοπίστηκε αρχικά το 1979 στις ακτές της Βόρειας Αλβανίας, στην περιοχή της πόλης Lac, σε μεγάλους σωρούς από μεταχειρισμένα ελαστικά (Adhami and Murati, 1987). Σχετικές έρευνες έδειξαν ότι το είδος είχε εγκατασταθεί με επιτυχία σε πολλές ακόμη περιοχές της χώρας (Adhami and Reiter, 1998). Στη συνέχεια, το *Ae. albopictus* εντοπίστηκε σε Ιταλία, αρχικά στην περιοχή της Γένοβας το Σεπτέμβριο του 1990 (Sabatini et al., 1990), στην Πάδοβα το 1991 (DallaPozza and Majori, 1992), και στη συνέχεια ακολούθησε η ραγδαία εξάπλωσή του σε πολλές περιοχές της Κεντρικής και Βόρειας Ιταλίας (Romi, 1995). Από το 1999 το *Ae. albopictus* έχει εντοπιστεί σε πολλές χώρες της Κεντρικής και Νότιας Ευρώπης όπως η Γαλλία το 1999 (Schaffner et al., 2001), το Βέλγιο το 2000 (Schaffner et al., 2004), το Μαυροβούνιο το 2001 (Petrić et al., 2001), η Ελβετία το 2003 (Flacio et al., 2004), η Ελλάδα το 2003-2004 (Samanidou-Voyadjoglou et al., 2005), η Κροατία το 2004 (Klobucar et al., 2006), η Ισπανία το 2004 (Aranda et al., 2006), η Βοσνία-Ερζεγοβίνη και Σλοβενία το 2005 (Petrić et al., 2006), η Ολλανδία το 2005 (Scholte et al., 2008) και η Γερμανία το 2007 (Pluskota et al., 2008). Τελευταία εντοπίστηκε και σε Βουλγαρία και Τουρκία (Medlock et al. 2012). Σε χώρες όπως η Ιταλία, η Γαλλία, η Ισπανία, η Κροατία, το Μαυροβούνιο και η Σλοβενία το *Ae. albopictus* έχει αναπτύξει ομοιογενείς πληθυσμούς και θεωρείται ότι εξαπλώνεται, ενώ σε Βέλγιο, Γερμανία και Ολλανδία έχει μεν εντοπιστεί, αλλά απέτυχε να εγκατασταθεί (E.C.D.C.

2009). Ωστόσο, η Ιταλία θεωρείται μακράν η περισσότερο προσβεβλημένη ευρωπαϊκή χώρα από το *Ae. albopictus* (E.C.D.C. 2015).

Η ικανότητα του *Ae. albopictus* να καλύπτει με πτήση μεγάλες αποστάσεις είναι περιορισμένη. Έτσι, ο κυριότερος τρόπος διασποράς του είναι συνήθως η παθητική μεταφορά. Το εμπόριο των μεταχειρισμένων ελαστικών θεωρείται ως ο κύριος τρόπος διασποράς του (Craven et al., 1988; Hawley, 1988), μέσω της απόθεσης ωών του. Τα ωά που είναι αρκετά ανθεκτικά στην αφυδάτωση, συντελούν στη μεταφορά του σε νέους τόπους, ακόμη και ηπείρους (Reiter and Sprenger, 1987). Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι μόνο η Ιαπωνία κατά το διάστημα 1988-1995 εξήγαγε περισσότερα από 49.000.000 μεταχειρισμένα ελαστικά σε 137 χώρες του κόσμου (Koliopoulos et al., 2008). Επίσης, τα τέλεια αλλά και τα ατελή στάδια του *Ae. albopictus* μπορεί να μεταφερθούν με οχήματα μέσω των οδικών αρτηριών (Medlock et al., 2012). Ένας ακόμη τρόπος εξάπλωσης των ωών και προνυμφών του *Ae. albopictus* είναι μέσω του διεθνούς εμπορίου των τροπικών καλλωπιστικών φυτών του γένους *Dracaena*, γνωστά με την κοινή ονομασία “lucky bamboo”. Τα συγκεκριμένα φυτά συσκευάζονται σε δοχεία με νερό για τη μεταφορά τους, με αποτέλεσμα να χρησιμεύσουν ως μέσα μεταφοράς των ωών και προνυμφών του *Ae. albopictus* από την Ασία στην Καλιφόρνια των Η.Π.Α. (Madon et al., 2004). Στην Ολλανδία, το *Ae. albopictus* εντοπίστηκε σε φυτώρια και θερμοκήπια στα οποία γινόταν εισαγωγή του τροπικού καλλωπιστικού φυτού *Dracaena sand eriana* από περιοχές της Νότιας Κίνας που ενδημεί το συγκεκριμένο είδος κουνουπιού (Scholte et al., 2008).

Η ραγδαία αποίκιση σε νέα ενδιαιτήματα και γεωγραφικές περιοχές του Βορείου Ημισφαιρίου, μακριά από τις περιοχές προέλευσης του *Ae. albopictus*, οφείλεται τόσο στην ευρεία γενετική και φυσιολογική παραλλακτικότητα του όσο και στην ικανότητα οικολογικής προσαρμογής του στις διαφορετικές κλιματικές συνθήκες, κυρίως μέσω της παραγωγής διαπαυόντων ωών-ανθεκτικών στο ψύχος (Hawley 1988, Medlock et al. 2012). Λαμβάνοντας υπ’ όψιν τους παθητικούς τρόπους εξάπλωσης του *Ae. albopictus*, σε συνδυασμό με τους χάρτες επικινδυνότητας (risk maps) της εισβολής του σε νέες περιοχές και τις εκτιμήσεις των κλιματικών αλλαγών από το E.C.D.C., εκτιμάται ότι είναι πιθανή η περαιτέρω εξάπλωση του συγκεκριμένου κουνουπιού και σε άλλες περιοχές της Ευρώπης (Medlock et al., 2012).

1.2.3.3. Εμφάνιση και διασπορά του *Ae. albopictus* στην Ελλάδα

Η γεωγραφική θέση και οι κλιματικές συνθήκες της Ελλάδας έχουν θεωρηθεί από αρκετούς ερευνητές στο παρελθόν ως ιδιαίτερα ευνοϊκές για την εισβολή του *Ae. albopictus*

(Mitchell, 1995; Knudsen et al., 1996; Bellini, 2001). Στη χώρα μας για πρώτη φορά εντοπίστηκε στην Κέρκυρα και την Ηγουμενίτσα μετά από δειγματοληψίες κουνουπιών κατά τα έτη 2003 και 2004 (Samanidou-Voyadjoglou et al., 2005). Εικάζεται ότι η είσοδος του *Ae. albopictus* στην Ελλάδα πραγματοποιήθηκε από τα λιμάνια της Κέρκυρας και της Ηγουμενίτσας λόγω της θαλάσσιας επικοινωνίας τους με λιμάνια της Ιταλίας, αλλά και της πόλης Χιμάρα της Αλβανίας όπου το συγκεκριμένο είδος κουνουπιού ήταν ήδη εγκατεστημένο (Velo and Bino, 2002; Samanidou-Voyadjoglou et al., 2005). Επίσης, το 2007 το *Ae. albopictus* εντοπίστηκε με παγίδες ωοθεσίας σε σταθμό φορτηγών κοντά στο τελωνείο του Προμαχώνα Σερρών (Voutsina and Karagiannidis, 2007). Οι δειγματοληψίες κουνουπιών σε περιοχές της Βόρειας και Δυτικής Ελλάδας, στο πλαίσιο των προγραμμάτων καταπολέμησης κουνουπιών, σε συνδυασμό με τα περιορισμένα δεδομένα της παρουσίας ειδών κουνουπιών από την υπόλοιπη χώρα, έδειξαν ότι μέχρι το 2007 η δραστηριότητα του *Ae. albopictus* περιοριζόταν σε εκείνες της περιοχές της χώρας (E.C.D.C. 2009).

Ωστόσο, το Σεπτέμβριο του 2008 τέλεια άτομα *Ae. albopictus* εντοπίστηκαν στην Ριζούπολη της Αθήνας, κοντά στο Β' Νεκροταφείο Αθηνών και το ρέμα του Ποδονύφτη. Τα κουνούπια προσκομίστηκαν στο Εργαστήριο Βιολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων του ΜΦΙ. από πολίτη ο οποίος συνέλεξε τέλεια άτομα από την αυλή του σπιτιού του και ανέφερε ότι τα συγκεκριμένα κουνούπια δραστηριοποιούνταν στην συγκεκριμένη περιοχή για πολλά χρόνια, προκαλώντας μεγάλη όχληση στους κατοίκους (Koliopoulos et al., 2008; Giatropoulos et al., 2012b). Επίσης, την περίοδο εκείνη αναφέρθηκε εντοπισμός προνυμφών και τελείων ατόμων *Ae. albopictus* στον Αστακό Αιτωλοακαρνανίας και το ΓΠΑ, στην περιοχή Βοτανικός της Αθήνας (Koliopoulos et al., 2008).

Γενικά, από την εποχή της πρώτης καταγραφής του στη Ελλάδα έως το 2010, το *Ae. albopictus* εμφάνισε αργά πρότυπα διασποράς. Στη συνέχεια, ξεκίνησε η ραγδαία εξάπλωσή του σε ολόκληρη σχεδόν την Ελλάδα (Badieritakis et al., 2018), με αποτέλεσμα έως το 2016 να έχει εντοπιστεί στις περισσότερες περιοχές της χώρας, εκτός από ένα κομμάτι της βόρειας Ελλάδας και τα νησιά του Αιγαίου. Πρόσφατες καταγραφές του *Ae. albopictus* σε νέες περιοχές της ευρύτερης Αττικής, στο νησί της Λέσβου, στα Χανιά της Κρήτης και την ανατολική Μακεδονία - Θράκη (Patsoula et al., 2017) αποδεικνύουν την ταχεία εξάπλωσή του. Σύμφωνα με τα στοιχεία ερευνών που εξετάζουν τις συνθήκες καταλληλότητας μιας περιοχής για την εγκατάσταση και εξάπλωση του *Ae. albopictus* και τις εκτιμώμενες αλλαγές στις κλιματικές συνθήκες, εκτιμάται ότι οι συνθήκες της Ελλάδας είναι ιδιαίτερα κατάλληλες για την εποίκηση της από *Ae. albopictus* (Tagaris et al., 2016).

1.2.3.4. Υγειονομική σημασία του *Ae. albopictus*

Η ικανότητα του *Ae. albopictus* να μεταδίδει πολυάριθμες και σοβαρές ασθένειες για τον άνθρωπο, με κυριότερη το Δάγκειο πυρετό, τη σημαντικότερη ιογενή λοίμωξη του ανθρώπου που μεταδίδεται με αρθρόποδα (αρμποϊός, arbovirus-arthropod borne disease), καθιστά το είδος αυτό ως ύψιστης υγειονομικής σημασίας. Ανεξάρτητα από την ικανότητα μετάδοσης ασθενειών, η υγειονομική σημασία του *Ae. albopictus* έγκειται και στην έντονη όχληση που προκαλεί με τα τσιμπήματά του, κυρίως στις αστικές περιοχές, όπου είναι δύσκολη η αντιμετώπισή του λόγω των πολυάριθμων εστιών ανάπτυξης των ατελών σταδίων του (Medlock et al., 2012). Μεταξύ των εισβαλόντων ειδών κουνουπιών που εντοπίζονται στην Ευρώπη, το *Ae. albopictus* αποτελεί πιθανότατα την κυριότερη απειλή για τη δημόσια υγεία στη Γηραιά Ήπειρο (Medlock et al., 2012).

Έχει αποδειχθεί ότι είναι ικανός φορέας για τη μετάδοση τουλάχιστον 22 αρμποϊών στο εργαστήριο, αλλά και των νηματωδών σκωλήκων του γένους *Dirofilaria* που προκαλούν ασθένειες κυρίως σε σκύλους και ανθρώπους, γνωστές ως διροφιλαριώσεις (Shroyer, 1986; Gratz, 2004; Becker et al., 2010). Το κουνούπι *Ae. albopictus* έχει αποδειχθεί ότι είναι ικανός φορέας στο πεδίο για την μετάδοση ποικίλων παθογόνων, με σημαντικότερα τον ιό του Δάγκειου πυρετού (DFV) και τον ιό Chikungunya (CHIKV).

Ο Δάγκειος πυρετός

Ο ιός του δάγκειου πυρετού υπάγεται στους φλαβοϊούς (Flaviviridae: *Flavivirus*) και απαντάται με 4 διαφορετικούς ορότυπους: DEN-1, DEN-2, DEN-3 και DEN-4, καθένας από τους οποίους μπορεί να προκαλέσει επιδημία (W.H.O., 1999). Ο τρόπος μετάδοσής τους στον άνθρωπο είναι μέσω των κουνουπιών του γένους *Aedes* (υπογένος *Stegomyia*), κυρίως μέσω των ειδών *Ae. Aegypti*, *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti* και *Ae. albopictus*, καθώς και των ειδών *Ae. scutellaris* και *Ae. polynesiensis* (Kettle, 1995; W.H.O., 1999). Οι τέσσερις ορότυποι του ιού είναι δυνατόν να μεταδοθούν μέσω των ωών τους (transovarial transmission) και στους απογόνους των μολυσμένων κουνουπιών (Shroyer, 1986). Εκτός από αυτόν το βασικό κύκλο μετάδοσης μεταξύ ανθρώπων και κουνουπιών των αστικών περιοχών, έχει αναφερθεί και ένας δευτερεύων κύκλος στη ζούγκλα της Μαλαισίας, μέσω του οποίου ο ιός μεταδίδεται μεταξύ των πρωτευόντων θηλαστικών (ανθρώπων, πιθήκων) και των δασικών ειδών κουνουπιών *Aedes (Finlaya) niveus* (W.H.O., 1999).

Η περίοδος από τη μολυσματική νύξη έως την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων στον άνθρωπο ποικίλει μεταξύ 3 έως 14 ημερών (W.H.O. 1999). Η νόσος είναι δυνατόν να είναι ασυμπτωματική ή να εκδηλωθεί με ένα από τα ακόλουθα κλινικά σύνδρομα: α) *Δάγκειος*

πυρετός (*DF-Dengue Fever*), β) Δάγκειος αιμορραγικός πυρετός (*DHF-Dengue Haemorrhagic Fever*) και γ) Σύνδρομο δάγκειου με καταπληξία (*DSS-Dengue Shock Syndrome*). Το τελευταίο σύνδρομο παρουσιάζει την υψηλότερη θνησιμότητα, η οποία κυμαίνεται στο 10-40 % των περιπτώσεων, ενώ η θνησιμότητα είναι ιδιαίτερα υψηλή στις δευτερογενείς προσβολές του δάγκειου πυρετού, όπου υπεισέρχονται και ανοσολογικοί παθογενετικοί μηχανισμοί. Η θεραπεία είναι συμπτωματική και περιλαμβάνει την ενδοφλέβια χορήγηση υγρών, ηπαρίνης, μεταγγίσεις αίματος κ.ά. Η παρασκευή εμβολίου που να προστατεύει από τη νόσο βρίσκεται ακόμα σε ερευνητικό στάδιο και η πρόληψη κατευθύνεται προς το παρόν στον έλεγχο των κουνουπιών-φορέων, μέσω εκτεταμένων προγραμμάτων καταπολέμησης, σε συνδυασμό με τη χρήση μέτρων ατομικής προστασίας (W.H.O., 2001a).

Ο Δάγκειος πυρετός θεωρείται ως η σημαντικότερη ασθένεια που μεταδίδεται με αρθρόποδα παγκοσμίως. Εκτιμάται ότι 2,5 δισεκατομμύρια άνθρωποι (το 40% του πληθυσμού της γης) ζει σε περιοχές που είναι ενδημικές για κάποιους από τους 4 οροτύπους του ιού, από τους οποίους είναι δυνατόν να μολυνθούν (W.H.O., 2013). Θεωρείται δε, ως νόσος ενδημική σε 102 χώρες: 20 της Αφρικής, 42 της Αμερικής, 7 της Νοτιοανατολικής Ασίας, 29 του Δυτικού Ειρηνικού και 4 της Ανατολικής Μεσογείου (W.H.O., 1999). Τα ετήσια κρούσματα του Δάγκειου πυρετού ανέρχονται παγκοσμίως σε 50 εκατομμύρια, εκ των οποίων τα 500.000 είναι περιπτώσεις Δάγκειου αιμορραγικού πυρετού με 22.000 θανάτους (W.H.O., 2013). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι κατά τα τελευταία 50 χρόνια τα κρούσματα Δάγκειου πυρετού αυξήθηκαν κατά 30 φορές. Πριν από το 1970, ο Δάγκειος αιμορραγικός πυρετός υπήρχε μόνο σε 9 χώρες, ενώ σήμερα ο αριθμός των χωρών αυτών έχει τουλάχιστον τετραπλασιαστεί και συνεχίζει να αυξάνεται (W.H.O., 2013). Τα αίτια της αύξησης της απειλής του Δάγκειου πυρετού αποδίδονται κυρίως στην ανεξέλεγκτη πληθυσμιακή έκρηξη με συσσώρευση πληθυσμού σε πόλεις με ανεπαρκές δίκτυο ύδρευσης, στη διάδοση του ιού και των κουνουπιών-φορέων μέσω των ταξιδιών και του εμπορίου (ιδιαίτερα εξαιτίας της διάδοσης του *Ae. albopictus*) καθώς και στην αποτυχία πολλών προγραμμάτων ελέγχου των κουνουπιών (W.H.O. 2000).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η σοβαρότερη επιδημία Δάγκειου πυρετού στην Ευρώπη σημειώθηκε τα έτη 1927-1928 στην Ελλάδα, όταν καταγράφηκαν περισσότερα από 1.000.000 κρούσματα κυρίως σε Αθήνα και Πειραιά (>90% του πληθυσμού είχε νοσήσει), με 1.553 θανάτους σε όλη τη χώρα (Papaevangelou and Halstead, 1977; Louis, 2012). Φορέας του ιού ήταν κατά πάσα πιθανότητα το είδος *Ae. aegypti*, το οποίο επικρατούσε την περίοδο εκείνη στη χώρα (Theiler et al., 1960). Στις μέρες μας, ιδιαίτερη ανησυχία για την επανεμφάνιση της ασθένειας στην ηπειρωτική Ευρώπη προκάλεσαν δύο περιπτώσεις αυτόχθονης μετάδοσης του δάγκειου πυρετού την περίοδο Σεπτέμβριος-Οκτώβριος 2010 στη Γαλλία και Κροατία (La-Ruche et al., 2010; Gjenero-Margan et al., 2011).

Ο ιός Chikungunya

Ο ιός Chikungunya ανήκει στο γένος *Alphavirus* της Οικογένειας *Togaviridae*, η οποία προκαλεί μια ιογενή λοίμωξη που ανήκει στην κατηγορία των αιμορραγικών πυρετών (E.C.D.C. 2007). «Chikungunya» στη γλώσσα των Σουαχίλι σημαίνει "αυτός που βαδίζει σκυφτός". Ο συγκεκριμένος ιός πήρε την ονομασία του από τον χαρακτηριστικό τρόπο με τον οποίο περπατούν οι πάσχοντες, οι οποίοι πονούν φοβερά στις αρθρώσεις (E.C.D.C., 2007a; Becker et al., 2010). Εκτός από την αρθραλγία και αρθρίτιδα σε πολλές αρθρώσεις του σώματος, τα συμπτώματα του ιού στον άνθρωπο περιλαμβάνουν ξαφνική αδιαθεσία, πυρετό, ρίγος, πονοκεφάλους και φωτοφοβία. Ο πυρετός συνήθως υποχωρεί μετά από 2-3 ημέρες, ενώ τα υπόλοιπα συμπτώματα, όπως οι πόνοι στις αρθρώσεις, μπορεί να διατηρηθούν για περίπου μια εβδομάδα. Ωστόσο, σε ορισμένες σοβαρές περιπτώσεις, κυρίως σε ηλικιωμένους ανθρώπους, η ίαση μπορεί να επέλθει μετά από μήνες. Αν και σπανίως, άνθρωποι άνω των 60 ετών μπορεί να πεθάνουν εξαιτίας επιπλοκών του συγκεκριμένου ιού.

Ο ιός, μετά την πρώτη του απομόνωση στις αρχές της δεκαετίας του '50 σε έναν άνθρωπο στην Τανζανία, έχει προκαλέσει πολυάριθμες εξάρσεις τόσο στην Αφρική όσο και τη νοτιοανατολική Ασία, προσβάλλοντας εκατοντάδες χιλιάδες ανθρώπων κατά τη δεκαετία του '60 (Σαββοπούλου-Σουλτάνη et al., 2011). Τα είδη *Ae. aegypti* και *Ae. albopictus* θεωρήθηκαν ως τα κύρια είδη κουνουπιών-φορέων που είναι υπεύθυνα για την μετάδοση του ιού -κατά τη διάρκεια των επιδημιών- από άνθρωπο σε άνθρωπο. Ωστόσο, στην Αφρική πρωτεύοντα θηλαστικά όπως οι πίθηκοι μπορεί να είναι ξενιστές του ιού από όπου θα προσβληθεί αργότερα ο άνθρωπος, ενώ στην ενζωοτική αυτή μετάδοση του ιού μπορεί να εμπλακούν και άλλα είδη κουνουπιών πέραν από εκείνα του γένους *Aedes* (*Stegomyia*) (Becker et al., 2010).

Μεγάλες πρόσφατες επιδημίες του ιού Chikungunya έχουν αναφερθεί το 2005 στα νησιά La Reunion (Γαλλικό νησί στο Ινδικό Ωκεανό), όταν προσβλήθηκαν περισσότεροι από 300.000 άνθρωποι και το 2006-7 στην Ινδία με περισσότερα από 2 εκατομμύρια περιπτώσεις προσβολής από το συγκεκριμένο ιό (Becker et al., 2010). Τον Ιούλιο-Οκτώβριο του 2007 ξέσπασε επιδημία του ιού Chikungunya στην περιοχή Ραβέννα της Ιταλίας με περισσότερα από 200 κρούσματα και έναν θάνατο (Angelini et al., 2007; Rezza et al., 2007), ενώ υπεύθυνο για τη συγκεκριμένη επιδημία θεωρήθηκε το *Ae. albopictus* που δραστηριοποιείται στη συγκεκριμένη περιοχή από το 1990 (Zgomba and Petric, 2008). Το Σεπτέμβριο του 2010 καταγράφηκαν 2 περιπτώσεις αυτόχθονης μετάδοσης του ιού σε περιοχή της νοτιοανατολικής Γαλλίας όπου επίσης δραστηριοποιείται το *Ae. albopictus* (Grandadam et al., 2011).

Διροφιλαριάσεις

Οι φιλαριάσεις είναι ομάδα νοσημάτων που οφείλονται σε νηματώδεις σκώληκες της υπεροικογένειας Filarioidea. Το *Ae. albopictus* αναφέρεται ότι είναι γνωστός φορέας των νηματωδών σκωλήκων του γένους *Dirofilaria*. Στην Ευρώπη, οι φιλαριάσεις που έχουν υγειονομική σημασία για τον άνθρωπο, οφείλονται στα είδη των νηματωδών σκωλήκων *Dirofilaria immitis* και *Dirofilaria repens* που προκαλούν διροφιλαριάσεις στους σκύλους, τις γάτες και ορισμένα άλλα θηλαστικά. Τα παράσιτα αυτά (νηματώδεις) δεν ωριμάζουν στο κυκλοφορικό σύστημα των ανθρώπων, με αποτέλεσμα αυτοί να μην εμφανίζουν συμπτώματα ή, σε σπάνιες περιπτώσεις, μπορεί να δημιουργήσουν διάφορες κλινικές εκδηλώσεις ανάλογα με την εντόπισή τους (υποδόρια, οφθαλμική ή πνευμονική) (Pampiglione and Rivasi, 2001).

Η διροφιλαρίαση του σκύλου (dog heartworm disease), που οφείλεται στο νηματώδη *Dirofilaria immitis* προκαλεί καρδιαγγειακή διροφιλαρίαση κυρίως στα σκυλιά και σπάνια στις γάτες (Boreham 1988). Η προσβολή από τη διροφιλαρία του σκύλου προκαλεί δυσλειτουργία στην κυκλοφορία του αίματος της καρδιάς, των πνευμόνων και των νεφρών του ζώου. Η διροφιλαρίαση του σκύλου είναι ενδημική στη νότια Ευρώπη (Σαββοπούλου-Σουλτάνη et al. 2011) και απαντάται σε σημαντικό ποσοστό και στην Ελλάδα.

Ο νηματώδης *Dirofilaria repens*, είναι το μολυσματικό αίτιο της ανθρώπινης υποδόριας διροφιλαρίασης (human subcutaneous dirofilariasis), ασθένειας που ενδημεί σε πολλές περιοχές της Νότιας και Ανατολικής Ευρώπης, ενώ έχουν αναφερθεί πολυάριθμα αυτόχθονα κρούσματα σε σκύλους τα τελευταία χρόνια και σε βορειότερες χώρες όπως η Γερμανία (Pantchev et al., 2009). Το παράσιτο (νηματώδης) ζει στον υποδόριο ιστό του ξενιστή, που είναι κυρίως οι σκύλοι, όπου και αναπαράγεται και στη συνέχεια μεταδίδεται με τα κουνούπια. Οι άνθρωποι προσβάλλονται σπάνια, ενώ είναι συνήθως περιστασιακοί ξενιστές του (Kramer et al., 2007). Τα κουνούπια που είναι φορείς του νηματώδη της ανθρώπινης υποδόριας διροφιλαρίασης, ανήκουν κυρίως στα γένη *Aedes*, *Culex* και *Anopheles* (Genchi et al., 2009). Μέχρι τα μέσα του προηγούμενου αιώνα η ανθρώπινη διροφιλαρίαση θεωρούνταν ως σπάνια ασθένεια. Όμως, τα κρούσματα αυξήθηκαν μετά το 1995 στην Ευρώπη και ιδιαίτερα την Ιταλία χωρίς όμως να αναφερθούν θάνατοι, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις η μόλυνση ήταν ασυμπτωματική. Στις περιπτώσεις όπου εμφανίζονταν συμπτώματα, αυτά ήσαν συνήθως υποδόρια και πνευμονικά οζίδια ή παρεγχυματικές αλλοιώσεις.

1.3. Αντιμετώπιση των κουνουπιών

Σήμερα, η αντιμετώπιση των κουνουπιών με στόχο την περιστολή της όχλησης και την προφύλαξη του πληθυσμού από τον κίνδυνο ασθενειών που μεταδίδουν, βασίζεται στη μείωση του πληθυσμού των κουνουπιών μέσω ολοκληρωμένων προγραμμάτων διαχείρισης κουνουπιών και στην παρεμπόδιση της επαφής μεταξύ κουνουπιών-διαβιβαστών και ανθρώπων. Σε περιοχές όπου υπάρχουν παράγοντες κινδύνου, όπως κρούσματα ασθενειών μεταδιδόμενων από κουνούπια ή σημαντικές εστίες αναπαραγωγής κουνουπιών, κρίνεται σκόπιμη η διενέργεια εκτίμησης κινδύνου για την εξάπλωση παθογόνων που μεταδίδονται με κουνούπια. Προκειμένου να επιτευχθεί ο ολοκληρωμένος έλεγχος των ασθενειών που μεταδίδονται με διαβιβαστές, από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization - WHO) προτείνεται η Ολοκληρωμένη Διαχείριση των Φορέων (Integrated Vector Management -IVM) (WHO, 2012b). Επομένως, στις περιοχές όπου η εκτίμηση κινδύνου οδηγεί στην πρόβλεψη μέτριου ή υψηλού κινδύνου τοπικής μετάδοσης, θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στις δράσεις καταπολέμησης των κουνουπιών-φορέων και ενημέρωσης του κοινού. Συγκεκριμένα, οι δράσεις αυτές αφορούν:

- Την εφαρμογή **ολοκληρωμένων προγραμμάτων καταπολέμησης κουνουπιών**. Βασικός σκοπός των προγραμμάτων αυτών είναι η ολιστική διαχείριση των κουνουπιών και των προβλημάτων που δημιουργούν τόσο στη δημόσια υγεία και το περιβάλλον, όσο και την τοπική οικονομία. Για την επιτυχία οποιουδήποτε προγράμματος καταπολέμησης κουνουπιών σε μια περιοχή έχει μεγάλη σημασία: α) η **σωστή, έγκαιρη** και η από κοινού **οργάνωσή του** από τους εμπλεκόμενους φορείς, β) ο **ορθός σχεδιασμός** του, με την αξιολόγηση όλων των διαθέσιμων επιστημονικών δεδομένων ή τεχνικών στοιχείων εφαρμογής των προγραμμάτων από προηγούμενα έτη και συνυπολογισμός των αποτελεσμάτων της επιδημιολογικής και εντομολογικής επιτήρησης, αλλά και των έκτακτων συνθηκών που πιθανώς διαμορφώνονται από έτος σε έτος, γ) η συστηματική **εντομολογική επιτήρηση**, με τη χαρτογράφηση των εστιών αναπαραγωγής των κουνουπιών, τη συστηματική παρακολούθηση και καταγραφή των ειδών και πληθυσμών τους, της κατανομής τους σε τόπο και χρόνο και δειγματοληπτικούς ελέγχους για τον εντοπισμό των μολυσμένων από συγκεκριμένα παθογόνα εντόμων, δ) οι **μέθοδοι καταπολέμησης** των κουνουπιών, όπως ο περιορισμός των εστιών ανάπτυξης των κουνουπιών, η αντιμετώπιση των προνυμφών και η καταπολέμηση των τελείων ατόμων, ε) η **προστασία του προσωπικού** και η **ενημέρωση του κοινού**, στ) ο **έλεγχος υπολειμμάτων των βιοκτόνων** και ζ) η **αξιολόγηση και ο απολογισμός των σχετικών ενεργειών-δράσεων**.

- **Μέτρα ατομικής προστασίας**. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η ενημέρωση και ευαισθητοποίηση του πληθυσμού των τοπικών κοινωνιών για τα κουνούπια και τις ασθένειες

που μπορεί αυτά να μεταδώσουν. Επίσης, η κατάδειξη των τρόπων ή μεθόδων με τις οποίες μπορούν να συμβάλλουν και οι ίδιοι στην αντιμετώπιση των εντόμων αυτών. Τα προτεινόμενα μέτρα αφορούν τη(ν):

- α) τοποθέτηση στις οικίες αντικουνουπικών πλεγμάτων (σίτες),
- β) χρήση κουνουπιέρων,
- γ) χρήση ανεμιστήρων ή κλιματιστικών,
- δ) απομάκρυνση του στάσιμου νερού από λεκάνες, βάζα, γλάστρες, υδρορροές κλπ,
- ε) κούρεμα γρασιδιού, θάμνων και φυλλωσιών,
- στ) πότισμα των φυτών κατά τις πρωινές ώρες,
- ζ) κάλυψη του σώματος με κατάλληλα -ανοικτού χρώματος- ενδύματα που προστατεύουν το σώμα, και
- η) χρήση εντομοαπωθητικών στο ακάλυπτο δέρμα και επάνω από τα ρούχα.

1.3.1. Μέθοδοι αντιμετώπισης

Η ολοκληρωμένη διαχείριση των κουνουπιών-φορέων βασίζεται στη χρήση όλου του φάσματος των διαθέσιμων παρεμβάσεων, είτε μεμονωμένα ή σε συνδυασμό, πάντοτε λαμβάνοντας υπ' όψιν τη γνώση των επιμέρους φορέων, τις ασθένειες που μεταδίδουν και τους παράγοντες που τυχόν επηρεάζουν τη μετάδοση των ασθενειών αυτών. Γενικά, πρώτιστος στόχος είναι η καταπολέμηση των προνυμφών των κουνουπιών και η εφαρμογή μέτρων διαχείρισης του περιβάλλοντος για τον περιορισμό των εστιών της ανάπτυξής τους. Συμπληρωματικά, όπου κρίνεται απαραίτητο για λόγους προστασίας της δημόσιας υγείας, πραγματοποιείται καταπολέμηση των τελείων εντόμων (Κολιόπουλος, 2011). Οι μέθοδοι που κατά κύριο λόγο χρησιμοποιούνται σήμερα για την αντιμετώπιση των κουνουπιών διακρίνονται σε βιολογικές, φυσικές, γενετικές, χημικές και μεθόδους περιβαλλοντικής διαχείρισης.

Περιβαλλοντική διαχείριση - Περιορισμός των εστιών ανάπτυξης

Ο περιορισμός των εστιών ανάπτυξης των κουνουπιών είναι ένα από τα σημαντικότερα μέτρα διαχείρισής τους, καθώς ελαχιστοποιείται η ευχέρεια πολλαπλασιασμού τους και επομένως μειώνεται η δυνατότητα ανάπτυξης υψηλών πληθυσμών τους. Με την εφαρμογή των μέτρων εξυγίανσης του περιβάλλοντος επιτυγχάνεται ο περιορισμός ή η εξάλειψη, όπου είναι δυνατόν, των εστιών ανάπτυξης των προνυμφών των κουνουπιών, μετά από τη χαρτογράφησή τους, λαμβάνοντας υπ' όψιν τα είδη των κουνουπιών που κυκλοφορούν σε τοπικό επίπεδο. Η περιβαλλοντική διαχείριση περιλαμβάνει τρεις κύριες τεχνικές: 1) την τροποποίηση των εστιών

ανάπτυξης των προνυμφών των κουνουπιών, δηλαδή μόνιμη τροποποίηση των δυνητικών εστιών ανάπτυξης, 2) τη διαχείριση των εστιών ανάπτυξης των προνυμφών, η οποία επιφέρει παροδικές αλλαγές στις εστίες ανάπτυξης των προνυμφών ώστε να αποτρέπεται η συμπλήρωση του βιολογικού τους κύκλου και 3) την τροποποίηση των ανθρώπινων συνηθειών, με τη μείωση της επαφής ανθρώπων-φορέων-παθογόνων (WHO, 1982). Ενώ για το αστικό περιβάλλον υλοποιούνται διαφορετικές ενέργειες περιβαλλοντικής διαχείρισης, για τις αγροτικές περιοχές και τους υγροτόπους, τα μέτρα συνήθως αναφέρονται σε:

- Αποστράγγιση ή επιχωμάτωση κοιλοτήτων του εδάφους.
- Καθαρισμό από τη βλάστηση των εστιών που έχουν υποδειχθεί από τη χαρτογράφηση, πχ αρδευτικά ή αποστραγγιστικά κανάλια ή τάφροι, δεξαμενές συλλογής νερού, όχθες ποταμών ή ρυακιών, κοίτες χειμάρρων κλπ. Έτσι, διευκολύνεται η κίνηση του νερού και παρασύρονται τα ατελή στάδια.
- Περιορισμό, εξάλειψη ή καθαρισμό των μικρών εστιών που βρίσκονται μέσα ή γύρω από τις κατοικημένες περιοχές, όπως συντριβάνια, καλλωπιστικές λιμνούλες, δεξαμενές εκτός λειτουργίας, αποχετεύσεις, διαρροές των συστημάτων ύδρευσης, δοχεία αποθήκευσης νερού ή άλλα αντικείμενα που κατακρατούν το νερό της βροχής ή του ποτίσματος, εγκαταλελειμμένοι χώροι και κτίρια όπου συνήθως συσσωρεύονται απορρίμματα πάσης φύσεως, βιολογικοί καθαρισμοί κλπ. Συγκεκριμένα, το είδος *Ae. albopictus* προτιμάει τα μικρά ή μεσαίου μεγέθους συνθετικά δοχεία (Carrieri et al., 2011). Στο πλαίσιο αυτό είναι σημαντική η ενημέρωση του κοινού σχετικά με τα ενδεικνύόμενα μέτρα πρόληψης, τα οποία συμπεριλαμβάνουν την εξάλειψη όλων των εστιών αναπαραγωγής κουνουπιών στους ιδιωτικούς χώρους (Unlu et al., 2013).

Βιολογικός έλεγχος

Ο βιολογικός έλεγχος αποσκοπεί στη μείωση του πληθυσμού-στόχου με τη χρήση αρπακτικών, παρασίτων, παθογόνων, ανταγωνιστών ή τοξινών των μικροοργανισμών. Σύμφωνα με τον Sarwar (2015), στο πεδίο υπάρχουν τρεις τρόποι εφαρμογής του βιολογικού ελέγχου οι οποίοι αφορούν στη διατήρηση των υπαρχόντων φυσικών εχθρών, την εισαγωγή νέων εχθρών και την εγκατάσταση ενός μόνιμου πληθυσμού-εχθρού με μαζική εκτροφή και περιοδική ή εποχιακή απελευθέρωση. Για το σκοπό αυτό υπάρχει ένας μακροσκελής κατάλογος ασπονδύλων και σπονδυλωτών οργανισμών στη φύση, οι οποίοι τρέφονται από τα κουνούπια ή τα θανατώνουν σε κάποιο από τα στάδια του βιολογικού τους κύκλου. Επίσης,

υπάρχουν αρκετοί οργανισμοί που έχουν παρουσιάσει ικανοποιητικά αποτελέσματα έναντι των κουνουπιών σε εργαστηριακές συνθήκες.

Οι κυριότεροι οργανισμοί που κατά καιρούς έχουν χρησιμοποιηθεί για τον βιολογικό έλεγχο των κουνουπιών είναι:

- *Προνυμφοφάγα ιχθύδια*: Τα συχνότερα χρησιμοποιούμενα είδη για τον έλεγχο των κουνουπιών είναι τα *Gambusia affinis* και *Poecilia reticulata*. Το πρώτο προέρχεται από τις νοτιοανατολικές πολιτείες της Αμερικής και εισήχθη σε πολλές χώρες για τον έλεγχο των ανωφελών κουνουπιών. Στην Ελλάδα, το είδος αυτό εισήχθη το 1927 για την καταπολέμηση της ελονοσίας και η παρουσία του είναι ακόμα και σήμερα διαδεδομένη στις περισσότερες φυσικές υδάτινες εστίες της χώρας (Κολιόπουλος, 2011). Πρόσφατα, ο Abebe και οι συνεργάτες του (2018) χρησιμοποίησαν τα είδη *Oreochromis niloticus* και *Tilapia Zilli* για τον έλεγχο των κουνουπιών στην Αιθιοπία παρατηρώντας σημαντική μείωση των προνυμφών (92%) κατά τις δοκιμές πεδίου (Abebe et al., 2018).

- *Κοπήποδα*: Τα γένη *Macrocylops* και *Mesocyclops* έχουν χρησιμοποιηθεί για τον πληθυσμιακό έλεγχο των κουνουπιών κυρίως σε τεχνητά δοχεία–εστίες αναπαραγωγής (Baldacchino et al., 2015). Η χρήση τους, ωστόσο, εμφανίζει ορισμένα μειονεκτήματα που σχετίζονται με την ανικανότητα επιβίωσής τους ελλείψει επιπρόσθετης τροφής και νερού και με την προσέλκυση των θηλυκών κουνουπιών για εναπόθεση ωών (Marten and Reid, 2007).

- *Μύκητες*: Υπάρχουν αρκετοί μύκητες με εντομοπαθογόνες ιδιότητες και ειδικότερα εναντίον των κουνουπιών. Τα κυριότερα γένη με καταγεγραμμένη εντομοπαθογόνο δράση κατά των κουνουπιών, είναι τα *Leptolegnia*, *Pythium*, *Lagenidium*, *Coelomomyces*, *Culicinomyces*, *Entomophthora*, *Beauveria* και *Metarhizium* (Scholte et al., 2004). Ειδικότερα, οι υπονομήκυτες *Metarhizium* και *Beauveria* παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως εναλλακτική μέθοδος πληθυσμιακού ελέγχου των κουνουπιών, εξαιτίας των προνυμφοκτόνων και ακμαιοκτόνων ιδιοτήτων τους (Scholte et al., 2007; Darbro et al., 2012). Ένα ακόμα πλεονέκτημα της χρήσης τους είναι ότι σκευάσματά τους κυκλοφορούν ήδη στο εμπόριο για την καταπολέμηση άλλων εντόμων οικονομικής σημασίας (Scholte et al., 2004).

- *Βακτήρια*: Σήμερα, σε εμπορική κλίμακα χρησιμοποιούνται σκευάσματα των παθογόνων βακίλων *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* (Bti) και *Lysinibacillus sphaericus* (Lsph) (Baldacchino et al., 2015). Εντομοκτόνο ρόλο διαδραματίζουν τα σπόρια των βακίλων που παράγουν τοξίνες, οι οποίες όταν καταναλωθούν προκαλούν βλάβη στο πεπτικό σύστημα των προνυμφών των κουνουπιών, ενώ είναι αβλαβείς για άλλους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Ο μικροβιακός παράγοντας *Bacillus thuringiensis* αποτελεί ένα επιτυχημένο παράδειγμα βιολογικού ελέγχου, ο οποίος δεν έχει ακόμα εμφανίσει σημαντικές οικολογικές διαταραχές, ακόμα και μετά την εντατική του χρήση σε μακροχρόνια

προγράμματα καταπολέμησης (Glare and O'Callaghan, 2003). Επιπλέον, η χρήση συμβιωτικών βακτηρίων του γένους *Wolbachia* έχει αρχίσει να προτείνεται ως ένα σύγχρονο μέσο αντιμετώπισης των κουνουπιών. Η συμβιωτική αυτή σχέση επάγει μια σειρά αναπαραγωγικών ανωμαλιών, όπως παρθενογένεση, θηλυκοποίηση και θανάτωση αρσενικών ατόμων. Επιπλέον, επάγει την «κυτταροπλασματική ασυμβατότητα», ένα είδος στειρότητας των αρσενικών, που αποτελεί και τη βάση της «Τεχνικής του Ασύμβατου Εντόμου» (Incompatible Insect Technique – ΙΙΤ) (Lees, 2015) (βλέπε σελ. 47, Γενετικός Έλεγχος). Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι το συγκεκριμένο βακτήριο μπορεί επίσης να μπλοκάρει τη μετάδοση ιών, στους οποίους συγκαταλέγονται οι ιοί των Δάγκειου, Chikungunya και Zika (Iturbe-Ormaetxe et al., 2011; Bourtzis et al., 2014).

- *Νηματώδεις σκόληκες*: Ενδιαφέρον για τον έλεγχο των κουνουπιών παρουσιάζουν οι νηματώδεις του γένους *Romanomermis*. Το είδος *Romanomermis culicivorax* έχει παραχθεί μαζικά και εφαρμοστεί σε εστίες κουνουπιών κατά τη δεκαετία του 1970 (Platzer, 1981). Στις μέρες μας πλέον δεν χρησιμοποιούνται σε ευρεία κλίμακα, λόγω προβλημάτων στη διατήρηση των ωών και στην ευαισθησία τους στις χαμηλές θερμοκρασίες του νερού και την υψηλή αλατότητα.

- *Αράχνες*: Παρ' ότι οι μελέτες που εξετάζουν τις αράχνες ως βιολογικούς παράγοντες καταπολέμησης των κουνουπιών είναι περιορισμένες, η κατάλληλη διαχείριση πληθυσμών αραχνών θεωρείται ότι μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στον έλεγχο των ακμαίων κουνουπιών και τον περιορισμό ασθενειών που μεταδίδονται από αυτά. Συγκεκριμένα, μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για τα είδη *Evarcha culicivora* από την Ανατολική Αφρική, *Crossopriza lyoni*, από την Ταϊλάνδη, και *Paracyrba wanlessi* από τη Μαλαισία υποστηρίζουν ότι τα είδη αυτά μπορούν να συμβάλλουν σε στρατηγικές καταπολέμησης της ελονοσίας στις αντίστοιχες γεωγραφικές περιοχές (Ndava and Llera, 2018).

Γενετικός έλεγχος

Ως γενετικός έλεγχος ορίζεται “η διάδοση, μέσω σύζευξης ή κληρονόμησης, παραγόντων που μειώνουν τις επιπτώσεις των επιβλαβών οργανισμών” (Alphey, 2014). Οι στρατηγικές του γενετικού ελέγχου στοχεύουν είτε στη μείωση των πληθυσμών-στόχων ή στην εισαγωγή ενός νέου επιθυμητού χαρακτηριστικού, με στόχο τη μείωση της βλάβης που προκαλείται από τον πληθυσμό-στόχο (Alphey, 2014). Έως σήμερα έχουν αναπτυχθεί πολλές διαφορετικές τεχνικές γενετικού ελέγχου των κουνουπιών. Πολλές από αυτές έχουν ήδη εφαρμοστεί και στο πεδίο.

Η τεχνική των στειρών εντόμων (Sterile Insect Technique, SIT) έχει στο παρελθόν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την εξάλειψη πληθυσμών εντόμων οικονομικής σημασίας για την κτηνοτροφία (*Cochliomyia hominivorax*) (Benedict and Robinson, 2003), τη γεωργία (μύγα της Μεσογείου, *Ceratitis capitata*) (Hendrichs et al., 2002) και τη μύγα τσε-τσε (*Glossina* spp.) (Vreysen et al., 2000). Η παραγωγή στο εργαστήριο στειρών αρσενικών εντόμων και η απελευθέρωσή τους στο περιβάλλον έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως και για τον πληθυσμιακό έλεγχο των κουνουπιών. Τα αρσενικά κουνούπια εκτίθενται σε ακτινοβολία ή στειρογόνα χημικά, με αποτέλεσμα να υφίστανται χρωμοσωμικές αλλοιώσεις ή θανατηφόρες μεταλλάξεις στο σπέρμα τους. Η φιλοσοφία της SIT στηρίζεται στην απελευθέρωση στειρών αρσενικών εντόμων, προκειμένου αυτά να συζευχθούν με τα θηλυκά των φυσικών πληθυσμών και τελικώς να μην παραχθούν απόγονοι. Η συνεχής απελευθέρωση τέτοιων στειρών αρσενικών, σε πολλαπλάσιους αριθμούς από εκείνους του φυσικού πληθυσμού-στόχου, τελικά οδηγεί σε σημαντική μείωση του μεγέθους του πληθυσμού και σε ειδικές περιπτώσεις ακόμα και στην πλήρη εξαφάνισή του. Ένας από τους περιορισμούς της τεχνικής αυτής είναι η μειωμένη ικανότητα των αρσενικών κουνουπιών που παράγονται να ανταγωνιστούν τους φυσικούς πληθυσμούς των αρσενικών στη σύζευξη (Reisen, 2003). Πρόσφατες μελέτες, έδειξαν ότι η ρύθμιση της δόσης της ακτινοβολίας μπορεί να εξασφαλίσει στειρότητα χωρίς να επηρεάσει σημαντικά την ανταγωνιστικότητά τους (Bellini et al., 2013; Madakacherry, 2014). Η μεγαλύτερη πρόκληση για την εφαρμογή της SIT σε ευρεία κλίμακα είναι η 100% αποτελεσματική απομάκρυνση των θηλυκών και η απελευθέρωση μόνο των στειρών αρσενικών κουνουπιών (Bellini et al., 2013). Για να ξεπεραστεί το πρόβλημα του ασφαλούς διαχωρισμού έχει εφαρμοστεί σε προγράμματα καταπολέμησης παρασίτων συνδυασμός της SIT με τη χρήση του συμβιωτικού βακτηρίου *Wolbachia*, ενέργεια που βασίζεται στην αντιπαρασιτική δράση του δεύτερου (Lees et al., 2015) (βλέπε σελ. 45, Βιολογικός Έλεγχος). Μία ακόμα παραλλαγή της τεχνικής SIT είναι και η τεχνική του ασύμβατου εντόμου (Incompatible Insect Technique, IIT), η οποία βασίζεται στην κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (Cytoplasmic Incompatibility, CI) που δημιουργεί το βακτήριο *Wolbachia*.

Μία παραλλαγή της SIT που χρησιμοποιεί τη γενετική μηχανική αντί της ακτινοβολίας είναι η απελευθέρωση εντόμων που φέρουν ένα επικρατές θνησιγόνο γονίδιο (Release of Insects with a Dominant Lethal gene, RIDL). Συγκεκριμένα, για τον έλεγχο των κουνουπιών χρησιμοποιείται για τα θηλυκά η τεχνική RIDL (female-specific RIDL, fsRIDL), σύμφωνα με την οποία απελευθερώνονται στο περιβάλλον αρσενικά άτομα ομόζυγα ως προς ένα επικρατές θνησιγόνο γονίδιο, ειδικό για τα θηλυκά (Alphey, 2014). Η μαζική εκτροφή τους πραγματοποιείται στο εργαστήριο, με τη χρήση ενός συστήματος υποκινητή-καταστολέα, ο οποίος μόλις αφαιρεθεί οδηγεί σε θανάτωση των θηλυκών ατόμων ξεπερνώντας έτσι και το

πρόβλημα του ασφαλούς διαχωρισμού των φύλων (Alphey, 2014). Όταν τα γενετικά τροποποιημένα αρσενικά έντομα ελευθερωθούν και συζευχθούν με αγρίου τύπου θηλυκά, δίνουν απογόνους ετερόζυγους ως προς το θνησιγόνο γονίδιο. Οι θηλυκοί απόγονοι πεθαίνουν, συνήθως στο στάδιο της προνύμφης ή της νύμφης, ενώ οι αρσενικοί μεταφέρουν το επικρατούν θνησιγόνο γονίδιο στους μισούς θηλυκούς απογόνους τους. Η περιοδική απελευθέρωση ομόζυγων αρσενικών ατόμων μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική μείωση του πληθυσμού-στόχου. Η τεχνική RIDL έχει εφαρμοστεί σε πληθυσμούς κουνουπιών *Ae. aegypti* (Lees et al., 2010) και *Ae. Albopictus* (Labbé et al., 2012), χρησιμοποιώντας την ανικανότητα πτήσης τους ως θνησιγόνο χαρακτηριστικό. Η πρώην Βρετανική εταιρία Oxitec Ltd. έχει ήδη προχωρήσει σε δοκιμές πεδίου με τη μαζική ελευθέρωση γενετικά τροποποιημένων κουνουπιών με την τεχνική RIDL στα νησιά Cayman, στη Μαλαισία, τον Παναμά και τη Βραζιλία (Harris et al., 2015).

Μια άλλη στρατηγική που χρησιμοποιεί γενετικά τροποποιημένα κουνούπια αναφέρεται στη μείωση της ικανότητάς τους να μεταδίδουν παρασιτικές ασθένειες. Πολλές είναι οι σχετικές τεχνολογίες οι οποίες έχουν αναπτυχθεί για την παραγωγή γενετικά τροποποιημένων στελεχών που εκφράζουν αντιπαρασιτικά γονίδια και καθιστούν τα κουνούπια μη αποτελεσματικούς φορείς σημαντικών νόσων (Ito et al., 2002). Η τεχνική αυτή έχει εφαρμοστεί κυρίως σε ανωφελή κουνούπια και το είδος *Ae. Aegypti*, με στόχο την καταπολέμηση της ελονοσίας και του Δάγκειου πυρετού αντίστοιχα. Η μαζική ελευθέρωση τέτοιων στελεχών έχει ως στόχο την αντικατάσταση των φυσικών πληθυσμών κουνουπιών με γενετικά τροποποιημένα στελέχη και συνεπώς τη μείωση της μετάδοσης των παρασιτικών ασθενειών (James, 2000). Η στρατηγική αυτή, ωστόσο, έχει δοκιμαστεί μόνο στο εργαστήριο.

Φυσικός έλεγχος

Ως φυσικός έλεγχος μπορεί να οριστεί η αντιμετώπιση των κουνουπιών με φυσικά και μηχανικά μέσα. Τεχνικές φυσικού ελέγχου χρησιμοποιούνται τόσο για την αντιμετώπιση των τελείων κουνουπιών, όσο και για τον έλεγχο των προνυμφών. Οι τεχνικές αυτές συνήθως χρησιμοποιούνται συνδυαστικά σε ολοκληρωμένα προγράμματα διαχείρισης φορέων.

Τα διαθέσιμα μέσα για τον φυσικό έλεγχο των προνυμφών που έχουν εφαρμοστεί και στο πεδίο είναι τα διογκούμενα σφαιρίδια πολυστυρενίου και οι επιφανειακές μεμβράνες. Τα **διογκούμενα σφαιρίδια πολυστυρενίου** σχηματίζουν ένα στρώμα στην επιφάνεια του νερού, το οποίο δεν επιτρέπει στα τέλεια έντομα να εναποθέσουν τα ωά τους, εμποδίζει τις προνύμφες και τις νύμφες να προσλαμβάνουν ατμοσφαιρικό οξυγόνο, περιορίζοντας τελικά τον αριθμό των τελείων που εκδύονται (Curtis and Minjas, 1985). Τα σφαιρίδια αυτά μπορεί να παραμείνουν αποτελεσματικά έως και τρία χρόνια, ενώ το μέγεθός αποτελεί περιοριστικό

παράγοντα για τη χρήση τους. Οι **επιφανειακές μεμβράνες** εφαρμόζονται στο νερό, όπου εξαπλώνονται γρήγορα σε όλη την υδάτινη επιφάνεια σχηματίζοντας φιλμ πάχους ενός μορίου (μονομοριακό φιλμ). Η εφαρμογή τους μειώνει την επιφανειακή τάση του νερού εμποδίζοντας αφενός την αναπνοή των προνυμφών/νυμφών των κουνουπιών, με αποτέλεσμα τη θανάτωσή τους και αφετέρου επιφέροντας τον πνιγμό των τελείων κουνουπιών και τον παρεμποδισμό της ωοτοκίας τους. Τα σκευάσματα αυτά εμφανίζουν χαμηλή τοξικότητα σε οργανισμούς μη-στόχους, ενώ συστήνονται και για εφαρμογή σε πόσιμο νερό. Τα προβλήματα που παρουσιάζουν αναφέρονται στη δυσκολία κάλυψης όλης της επιφάνειας του νερού, εξαιτίας φυσικών εμποδίων και της αρνητικής επίδρασης των ανέμων (Becker et al., 2010).

Η διαχείριση των τελείων κουνουπιών με φυσικά ή μηχανικά μέσα έχει ως στόχο κυρίως την προστασία συγκεκριμένων χώρων διαβίωσης του ανθρώπου ή των ζώων από την παρουσία και τις επιθέσεις των εντόμων αυτών. Η τοποθέτηση **λεπτών πλεγμάτων (σίτες)** σε πόρτες και παράθυρα και η χρήση **κουνουπιέρας**, συνήθως βοηθούν αρκετά αποτελεσματικά στην προστασία των σπιτιών από την είσοδο των κουνουπιών και την εξασφάλιση ενός ικανοποιητικού επιπέδου προστασίας κατά τη διάρκεια του ύπνου. Επίσης, οι **παγίδες μαζικής συλλογής** τελείων κουνουπιών (ovitraps) που χρησιμοποιούν ως ελκυστικό μέσο το φως, το CO₂, υδρατμούς, θερμότητα ή κάποια άλλη χημική ένωση μπορούν να συλλάβουν και να θανατώσουν σημαντικό αριθμό κουνουπιών στους χώρους διαβίωσης των ανθρώπων ή γύρω από αυτούς. Οι παγίδες αυτές βασίζονται στη συνήθεια των θηλυκών κουνουπιών κυρίως του γένους *Aedes* να εναποθέτουν τα ωά τους σε μικρά δοχεία (Fonseca et al., 2013). Τέλος, έχουν αναπτυχθεί συσκευές που χρησιμοποιούν **ακτινοβολία** για τη θανάτωση των θηλυκών κουνουπιών (Guth, 2009), των οποίων η χρήση συστήνεται κυρίως για την «οχύρωση» χώρων διαβίωσης.

Χημική καταπολέμηση

Η αντιμετώπιση των κουνουπιών με χημικά μέσα αναφέρεται στη χρήση εντομοκτόνων για την καταπολέμηση των ατελών και τελείων εντόμων, με στόχο τη μείωση των πληθυσμών τους ή/και τη χρήση εντομοαπωθητικών για τη μείωση της επαφής των τελείων εντόμων με τον άνθρωπο. Είναι σημαντικό να αναφερθεί, ότι η χημική αντιμετώπιση των κουνουπιών βασίζεται στη χρήση βιοκτόνων υγειονομικής σημασίας, δηλαδή χημικών τοξικών ουσιών που παρεμβαίνουν στις φυσιολογικές λειτουργίες του εντόμου. Επομένως, τα χημικά σκευάσματα που χρησιμοποιούνται πρέπει υποχρεωτικά να διαθέτουν έγκριση κυκλοφορίας και να εφαρμόζονται σύμφωνα με τις οδηγίες ασφαλούς και ορθής χρήσης που περιγράφονται στην

ετικέτα τους, ώστε να επιτυγχάνεται η μέγιστη αποτελεσματικότητά τους, η προστασία του χρήστη, της δημόσιας υγείας και του περιβάλλοντος.

Σύμφωνα με την Επιτροπή Δράσης κατά της Ανθεκτικότητας στα Εντομοκτόνα (Insecticide Resistance Action Committee, IRAC), τα εντομοκτόνα κατηγοριοποιούνται σε 32 ομάδες σύμφωνα τη χημική ομάδα ή/και το μηχανισμό δράσης τους. Οι κυριότερες ομάδες χημικών εντομοκτόνων που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των κουνουπιών είναι:

- *Τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα:* Ανταγωνίζονται την είσοδο του χλωρίου στους νευρώνες παρεμποδίζοντας προσυναπτικά τη μετάδοση των νευρικών σημάτων. Έχουν νευροτοξική δράση, προκαλώντας πολλαπλές εκφορτίσεις, μεγάλη νευρική διέγερση και τελικά το θάνατο.

- *Τα οργανοφωσφορικά:* Περιέχουν φώσφορο και έχουν σταδιακά αντικαταστήσει τα έμμονα οργανοχλωριωμένα. Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα χαρακτηρίζονται από μειωμένη χημική σταθερότητα και υψηλή τοξικότητα στα σπονδυλωτά. Ο βιοχημικός μηχανισμός δράσης τους είναι η μη αναστρέψιμη παρεμπόδιση του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE, acetylcholine esterase inhibitors) στις χολινεργικές συνάψεις. Ως αποτέλεσμα παρατηρείται μια υπέρμετρη συσσώρευση του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη, η οποία οδηγεί στο “βραχυκύκλωμα” του συστήματος μετάδοσης των νευρικών σημάτων, προκαλώντας τελικά μια πληθώρα νευρομεταδόσεων στους νευρώνες του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η νευροτοξική αυτή δράση του οδηγεί σε υπερδιέγερση, μεγάλη κινητικότητα, σπασμούς, παράλυση και τελικά στο θάνατο του εντόμου.

- *Τα καρβαμιδικά:* Δρουν όπως τα οργανοφωσφορικά, ως αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE, acetylcholine esterase inhibitors) με τη διαφορά ότι είναι αναστρέψιμη η παρεμπόδιση του ενζύμου (Dent 1991). Παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα δράσης, με επακόλουθο να χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση φορέων που έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητες σε οργανοχλωριωμένα και οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (Becker et al., 2010).

- *Τα πυρεθρινοειδή:* Είναι μια νέα κατηγορία ιδιαίτερα δραστικών εντομοκτόνων που προέκυψε κατά την προσπάθεια βελτίωσης της βιολογικής δράσης και χημικής σταθερότητας των φυσικών πυρεθρινών, τα οποία απομονώνονται από τα άνθη των ειδών *Chrysanthemum* spp. Παρουσιάζουν παρόμοιο τρόπο δράσης με τα οργανοχλωριωμένα, παρεμποδίζοντας προσυναπτικά τη μετάδοση των νευρικών σημάτων. Οι συνθετικές πυρεθρίνες χαρακτηρίζονται από ακαριαία δράση (knockdown effect), λόγω της γρήγορης μυϊκής παράλυσης που προκαλούν στα έντομα.

- *Οι ρυθμιστές ανάπτυξης (Insect Growth Regulators –IGRs):* Οι ρυθμιστές ανάπτυξης αντιπροσωπεύουν μια νέα γενιά εντομοκτόνων που παρεμποδίζουν τη φυσιολογική ανάπτυξη

και την εξέλιξη των εντόμων. Με βάση το βιοχημικό μηχανισμό δράσης ή τις μεταβολικές διεργασίες που επηρεάζουν, οι ενώσεις αυτές διακρίνονται σε: α) όσες επηρεάζουν τη λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος των εντόμων (Juvenile Hormone Analogs, JHA) και β) παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης της χιτίνης (Chitin Synthesis Inhibitors, CSI). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα ανάλογα των ορμονών methoprene, fenoxycarb, pyriproxifen και στη δεύτερη τα παράγωγα της βενζοϋλουρίας (διφλουβενζουρόνη και νοβαλουρόνη) (Becker et al., 2010). Η εφαρμογή των ρυθμιστών ανάπτυξης θα πρέπει να γίνεται κατά την κατάλληλη εποχή και στο κατάλληλο στάδιο ανάπτυξης του εντόμου. Για να είναι αποτελεσματική, απαιτείται συνεχής παρακολούθηση της βιολογίας και οικολογίας των υπό αντιμετώπιση ειδών, γεγονός που συνεπάγεται την ύπαρξη κατάλληλα οργανωμένων εργαστηρίων και εξειδικευμένου προσωπικού.

Χημική αντιμετώπιση των προνυμφών

Η χημική αντιμετώπιση των προνυμφών των κουνουπιών στοχεύει στην καταπολέμησή τους στις εστίες ανάπτυξής τους με τη χρήση τοξικών ουσιών που εφαρμόζονται απ' ευθείας στο νερό. Οι χημικές ουσίες δρουν παρεμβαίνοντας στις φυσιολογικές και βιολογικές λειτουργίες των προνυμφών, οδηγώντας τελικά στη θανάτωσή τους. Τα προνυμφοκτόνα σκευάσματα που χρησιμοποιούνται ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες εντομοκτόνων. Στην Ελλάδα, τα εγκεκριμένα βιοκτόνα που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση των προνυμφών των κουνουπιών είναι όσα περιέχουν ένα από τα ακόλουθα δραστικά συστατικά: το βιολογικό παράγοντα *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* (B.t.i.) (2 σκευάσματα) και το ρυθμιστή ανάπτυξης diflubenzuron (IGR εντομοκτόνο) (3 σκευάσματα) ([Εγκύκλιος, 2020](#)).

Η καταπολέμηση των προνυμφών των κουνουπιών με βιοκτόνα θα πρέπει να εφαρμόζεται εγκαίρως στις υδάτινες εστίες ανάπτυξής τους, ώστε να καταπολεμηθεί η πρώτη γενεά των κουνουπιών. Η εφαρμογή των βιοκτόνων πραγματοποιείται από εδάφους χρησιμοποιώντας κατάλληλα ψεκαστικά μηχανήματα, ώστε το βιοκτόνο να φθάσει στην επιφάνεια του νερού της εστίας και να μην κατακρατείται από την υπάρχουσα βλάστηση. Ιδιαίτερη έμφαση πρέπει να δίνεται στην ομοιόμορφη -και σε όλη την έκτασή τους- κάλυψη των εστιών. Αεροψεκασμοί διενεργούνται μόνο σε ειδικές περιπτώσεις, εφόσον υπάρχει διαπιστωμένη αδυναμία κάλυψης των εστιών με επίγεια μέσα (πχ. ορυζώνες, έλη κλπ.) και κατόπιν λήψεως ειδικής αδείας από τις αρμόδιες αρχές.

Κατά την επιλογή των βιοκτόνων θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπ' όψιν η χρήση για την οποία προορίζεται το νερό της κάθε εστίας και η χρήση να γίνεται σύμφωνα με την ετικέτα του προϊόντος, δεδομένου ότι τα βιοκτόνα αυτά μπορούν να προκαλέσουν ρύπανση

του περιβάλλοντος ή/και τοξικότητα σε διάφορους οργανισμούς. Ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στις περιπτώσεις που το νερό προορίζεται για απόληψη πόσιμου νερού, χρησιμοποιείται για το πότισμα των ζώων και την άρδευση των καλλιεργειών, στα ιχθυοτρόφα ύδατα, αλλά και γενικότερα στις περιπτώσεις παρουσίας σε αυτό άλλων υδρόβιων οργανισμών. Σε οικολογικά προστατευόμενες περιοχές (Natura κλπ.) ενδείκνυται μόνο η χρήση των σκευασμάτων B.t.i., των οποίων η δράση είναι εκλεκτική. Δεν ενδείκνυται η χρήση οποιουδήποτε χημικού σκευάσματος για την καταπολέμηση των κουνουπιών σε νερά που προορίζονται για απόληψη πόσιμου νερού καθώς και σε ιχθυοτρόφα ύδατα, δεδομένου ότι όλα είναι περισσότερα ή λιγότερα τοξικά για τους υδρόβιους οργανισμούς, και επομένως μπορεί να προκληθούν οικονομικές ζημιές αλλά και βλαβερές επιπτώσεις στη δημόσια υγεία και στο περιβάλλον.

Χημική αντιμετώπιση των τελείων κουνουπιών

Η χημική αντιμετώπιση των τελείων κουνουπιών αφορά τη χρήση βιοκτόνων με στόχο τον πληθυσμιακό τους έλεγχο, αλλά και τη χρήση εντομοαπωθητικών που συμβάλλουν στην παρεμπόδιση της επαφής μεταξύ κουνουπιών και ανθρώπων. Η χρήση βιοκτόνων για τον έλεγχο των ακμαίων κουνουπιών θα πρέπει να εφαρμόζεται ως συμπληρωματική ενέργεια στην καταπολέμηση των προνυμφών, όταν το πρόβλημα είναι ιδιαίτερα οξύ ή όταν το επιβάλλουν συγκεκριμένες συνθήκες, όπως η εμφάνιση επιδημιών οφειλόμενων στα κουνούπια (Κολιόπουλος, 2011).

Οι υπολειμματικοί ψεκασμοί εσωτερικών χώρων (Indoor residual spraying, IRS) συνιστώνται ιδιαιτέρως από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), καθώς έχουν συμβάλει σημαντικά στην καταπολέμηση της ελονοσίας που μεταδίδεται από το “ανοφελής” κουνούπι (WHO, 2013). Η εφαρμογή των υπολειμματικών ψεκασμών σε εσωτερικούς χώρους διενεργείται όπου διημερεύουν τα τέλεια κουνούπια, όπως οι τοίχοι και οι οροφές των οικιών και πάσης φύσεως καταλυμάτων, οι παρακείμενοι θάμνοι ή αγριόχορτα, καθώς και γύρω από τις εστίες αναπαραγωγής των κουνουπιών. Οι ψεκασμοί αυτοί πρέπει να προηγούνται των επεμβάσεων κατά των προνυμφών και να επαναλαμβάνονται το φθινόπωρο για τα είδη που διαχειμάζουν στο στάδιο του τέλειου, ενώ ενδιάμεσοι ψεκασμοί, κατά τη θερινή περίοδο, θα πρέπει να πραγματοποιούνται μόνο όταν υπάρχει πολύ έντονο πρόβλημα όχλησης ή σε έκτακτες συνθήκες, όπως η εμφάνιση επιδημιών. Θα πρέπει να σημειωθεί, ότι η εφαρμογή υπολειμματικών ψεκασμών εσωτερικών χώρων θα πρέπει να γίνεται αποκλειστικά από κατάλληλα εκπαιδευμένο προσωπικό με τα αντίστοιχα εγκεκριμένα σκευάσματα και σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης τους, κατόπιν χορήγησης ειδικής αδείας από τις αρμόδιες αρχές. Στην Ελλάδα, οι εγκεκριμένες δραστικές ουσίες για τη διενέργεια υπολειμματικών ψεκασμών (μη

υδάτινων επιφανειών) ανήκουν στα πυρεθροειδή ([Εγκύκλιος, 2020](#)) και κατά κύριο λόγο φέρονται σε σκευάσματα βρέξιμης σκόνης (WP), γαλακτοματοποιήσιμου συμπυκνώματος (EC) και πυκνού εναιωρήματος (SC). Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας των ψεκασμών και τον προσδιορισμό της διάρκειας της βιολογικής δράσης των εντομοκτόνων που χρησιμοποιούνται, πραγματοποιούνται βιοδοκιμές σύμφωνα με τη μέθοδο που προτείνει ο ΠΟΥ (WHO, 2006)

Οι **ψεκασμοί/καπνισμοί χώρων (Space spray/fogging)** αφορούν την εφαρμογή εντομοκτόνου σε μορφή πολύ μικρού μεγέθους σταγονιδίου, ώστε να μοιάζει με καπνό ή σε ψεκασμό υπέρμικρου όγκου (Ultra Low Volume–ULV). Αυτός ο τρόπος εφαρμογής έχει ως αποτέλεσμα η εντομοκτόνος ουσία να δρα μέσω επαφής και χωρίς υπολειμματική διάρκεια. Η εφαρμογή της μεθόδου γίνεται κυρίως κατά τη διάρκεια έξαρσης κάποιας επιδημίας ή όταν αποσκοπείται άμεσα η μείωση του πληθυσμού των τελείων κουνουπιών. Τα εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται ανήκουν στην ομάδα των συνθετικών πυρεθρινοειδών. Στην Ελλάδα εφαρμόστηκε ψεκασμός υπέρμικρου όγκου κατά τη διάρκεια των επιδημιών του ιού του Δυτικού Νείλου στη Δυτική Θεσσαλονίκη το 2010 και στο Μαραθώνα Αττικής το 2011.

Η χρήση **κουνουπιέρων εμβαπτισμένων σε εντομοκτόνα (Insecticide-Treated Nets, ITNs)** έχει αποδειχθεί πολύ αποτελεσματική για τον έλεγχο της ελονοσίας σε περιοχές όπου το κουνούπι-φορέας εισέρχεται εντός των οικιών για τη λήψη αίματος, κυρίως, κατά τη διάρκεια της νύχτας. Για τον εμποτισμό τους χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο ένα πυρεθρινοειδές εντομοκτόνο, που είναι ικανό να θανατώνει τα κουνούπια όταν αυτά έρχονται σε επαφή με τα δίχτυα. Ένα από τα μέτρα αντιμετώπισης της ελονοσίας στο Δήμο Ευρώτα του Νομού Λακωνίας το 2013 ήταν και η χρήση 400 εμποτισμένων κουνουπιέρων (bednets) από μετανάστες–εργάτες, οι οποίοι προέρχονταν από χώρες που ενδημεί η ελονοσία (MALWEST, 2013).

Ως **εντομοαπωθητικά χώρου** θεωρούνται οι χημικές ενώσεις, οι οποίες στην αέρια φάση τους παρεμποδίζουν την επαφή των εντόμων με τον άνθρωπο, επεμβαίνοντας στη φυσιολογική συμπεριφορά του εντόμου εντός ορισμένης περιοχής ή “ασφαλούς ζώνης” (χώρος που κατοικείται από ανθρώπους) και καθιστώντας το χώρο αυτό ακατάλληλο για το έντομο. Ως εντομοαπωθητικά χώρου χρησιμοποιούνται διάφορα πτητικά βιοκτόνα, όπως οι φυσικές πυρεθρίνες και τα συνθετικά πυρεθροειδή, σε τρεις κυρίως μορφές σκευασμάτων: α) τις καπνογόνες σπείρες, β) τα ηλεκτροθερμαινόμενα πλακίδια και γ) τα υγρά εντομοαπωθητικά χώρου. Στην Ελλάδα κυκλοφορούν τουλάχιστον 60 εμπορικά σκευάσματα της κατηγορίας αυτής, ενώ στο εμπόριο διατίθενται και βιοκτόνα-εντομοαπωθητικά τύπου αερολύματος. Επίσης, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός προϊόντων, όπως τα αρωματικά κεριά με βάση τη

σιτρονέλα, τα οποία δεν έχουν ελεγχθεί από τις αρμόδιες υπηρεσίες και, ως εκ τούτου, η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητά τους δεν είναι εγγυημένη.

Η χρήση απωθητικών χώρου με υποθανάτιες δόσεις εντομοκτόνου εμφανίζει τα παρακάτω πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τις παραδοσιακές τεχνικές που εφαρμόζουν εντομοκτόνα σε δόσεις που θανατώνουν τα έντομα: α) καθυστέρηση εμφάνισης ανθεκτικότητας σε σύγκριση με τους υπολειμματικούς ψεκασμούς των επιφανειών των εσωτερικών χώρων (IRS) και τη χρήση εμποτισμένων με εντομοκτόνα κουνουπιέρων (ITNs), β) αποτελεσματικότητα και σε εξωτερικούς χώρους (όπου τα IRS και ITNs έχουν ελάχιστη εφαρμογή), γ) παρέμβαση σε βασικές συνήθειες των εντόμων, αποτρέποντας τη δυνατότητα τροποποίησης της συμπεριφοράς τους, δ) δράση σε αρκετά διαφορετικά είδη εντόμων με διαφορετική συμπεριφορά και ε) αυξημένη παραγωγή, λόγω δράσης τους και σε έντομα μεγάλης οικονομικής σημασίας (Achee et al., 2012).

Τα **εντομοαπωθητικά για ατομική προστασία** εφαρμόζονται απ' ευθείας στο γυμνό δέρμα ή τα ρούχα, με στόχο να προστατεύσουν το άτομο από τα τσιμπήματα των κουνουπιών ή άλλων αιμομυζητικών αρthropόδων. Οι εγκεκριμένες στην Ελλάδα (2020) δραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται σε απωθητικά σκευάσματα εναντίον των κουνουπιών είναι το DEET (N,N-diethyl-3-methylbenzamide), η ικαριδίνη (icaridin), το IR3535 (ethyl butylacetylaminopropionate), η γερανιόλη, τα αιθέρια έλαια του ευκάλυπτου *Corymbia citriodora*, της λεβάντας και της μέντας, καθώς και τα εκχυλίσματα της αζαδιράχτας *Azadirachta indica* και του χρυσάνθεμου *Chrysanthemum cinerariaefolium* (http://www.minagric.gr/syspest/syspest_bycat_byactive.aspx).

1.3.2. Περιορισμοί στη σύγχρονη αντιμετώπιση των κουνουπιών

1.3.2.1. Ανάπτυξη ανθεκτικότητας

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας ορίζει ως “ανθεκτικότητα” το κληρονομούμενο χαρακτηριστικό ενός πληθυσμού εντόμων να επιβιώνει σε δόσεις εντομοκτόνου που θα έπρεπε να θανατώνουν την πλειονότητα των ατόμων ενός φυσιολογικού πληθυσμού του ίδιου είδους (Brown and Ral, 1971). Η ανθεκτικότητα εμφανίζεται όταν γενετικές μεταλλαγές που συμβαίνουν στη φύση επιτρέπουν σε άτομα ενός πληθυσμού εντόμων να αντιστέκονται και να επιβιώνουν στις θανατηφόρες επιδράσεις ενός εντομοκτόνου. Εάν το πλεονέκτημα των ατόμων αυτών διατηρηθεί με την επαναλαμβανόμενη χρήση του ίδιου εντομοκτόνου, τα ανθεκτικά άτομα θα αναπαραχθούν και οι κληρονομούμενες αυτές διαφοροποιήσεις, στις οποίες οφείλεται η ανθεκτικότητα, θα μεταφερθούν στους απογόνους, ώστε τελικά αυτοί να επικρατούν μέσα σε έναν πληθυσμό.

Οι περισσότεροι μηχανισμοί ανθεκτικότητας ελέγχονται από υπολειπόμενα γονίδια. Στη φύση, οι πληθυσμοί των εντόμων που δεν έχουν ποτέ εκτεθεί σε εντομοκτόνα είναι συνήθως πολύ ευαίσθητοι, και τυχόν γονίδια ανθεκτικότητας σε αυτούς τους πληθυσμούς είναι πολύ σπάνια. Αυτό συμβαίνει επειδή τα άτομα που φέρουν τα ανθεκτικά γονίδια στερούνται ορισμένων χαρακτηριστικών, τα οποία κάνουν τα ευαίσθητα άτομα να κυριαρχούν σε συνθήκες απουσίας πίεσης από εντομοκτόνο. Τα χαρακτηριστικά αυτά μπορεί να είναι ο μειωμένος αριθμός των απογόνων, το προσδόκιμο ζωής και η ευρωστία των ανθεκτικών ατόμων. Οι ανθεκτικοί πληθυσμοί συνήθως μετατρέπονται σε ευαίσθητους όταν δεν διατηρείται η επιλεκτική πίεση του εντομοκτόνου (IRAC, 2011).

Οι παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση και το ρυθμό εξάπλωσης της ανθεκτικότητας, μπορούν να διαχωριστούν σε τρεις βασικές κατηγορίες σύμφωνα με τους Georghiou και Taylor (1986): α) *γενετικοί*: συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικού γονιδίου, αριθμός γονιδίων που επιφέρουν ανθεκτικότητα, κυριαρχία των ανθεκτικών γονιδίων, προηγούμενη έκθεση σε εντομοκτόνα, β) *βιολογικοί/οικολογικοί*: ταχύτητα αναπαραγωγής, αριθμός απογόνων ανά γενιά, ποσοστό απομόνωσης του πληθυσμού, κινητικότητα και μετανάστευση, τυχαία επιβίωση ή χρήση καταφυγίων, γ) *παράγοντες που αφορούν στο εντομοκτόνο και τον τρόπο εφαρμογής του*: χημική ομάδα εντομοκτόνου, σχετικότητα με σκευάσματα που έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν, υπολειμματική διάρκεια, τύπος σκευάσματος, στάδιο του εντόμου το οποίο καταπολεμείται, συχνότητα επεμβάσεων, ποσοστό κάλυψης κατά την εφαρμογή.

Οι βασικότεροι μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα είναι τέσσερις: α) η μεταβολική ανθεκτικότητα, β) η ανθεκτικότητα στόχου, γ) η ανθεκτικότητα μέσω της τροποποίησης της συμπεριφοράς των εντόμων ώστε να αποφεύγεται η έκθεσή τους στους τοξικούς παράγοντες και δ) η ανθεκτικότητα λόγω μειωμένης διαπερατότητας της επιδερμίδας των εντόμων (Hemingway et al., 2002). Πρώτη γραμμή άμυνας αποτελούν οι διαφοροποιήσεις στη δερμίδα και αλλαγές στη συμπεριφορά, οι οποίες είτε εμποδίζουν την είσοδο ή αυξάνουν την απέκκριση των εντομοκτόνων (φυσιολογική-ηθολογική ανθεκτικότητα). Δεύτερη γραμμή άμυνας είναι η μεταβολική ανθεκτικότητα, η οποία συνίσταται από ένζυμα που “μεταβολίζουν” τα εντομοκτόνα (ή ενεργοποιημένα παράγωγά τους) πριν αυτά φτάσουν στους στόχους τους. Η τελευταία γραμμή άμυνας των εντόμων, η οποία συχνά προκαλεί τα πιο εντυπωσιακά επίπεδα ανθεκτικότητας, αφορά διαφοροποιήσεις στη μοριακή δομή των πρωτεϊνών-στόχων που τις κάνουν λιγότερο ευαίσθητες στα τοξικά μόρια, με αποτέλεσμα τη μείωση ή και την απώλεια της αποτελεσματικότητας των εντομοκτόνων (Βόντας και συν., 2007).

Στη βάση των επίσημα καταγεγραμμένων ανθεκτικών αρθροπόδων (Arthropod Pesticide Resistance Database, APRD) υπάρχουν καταχωρημένα τουλάχιστον 125 διαφορετικά είδη κουνουπιών με καταγεγραμμένη στο πεδίο ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα. Για τα είδη αυτά έχει καταγραφεί περίπτωση ανθεκτικότητας σε τουλάχιστον έναν πληθυσμό και σε τουλάχιστον μία δραστική ουσία. Ανάπτυξη ανθεκτικότητας έχει καταγραφεί παγκοσμίως για τα είδη των γενών με μεγάλη υγειονομική σημασία: *Aedes*, *Culex* και *Anopheles*. Στην Ελλάδα έχει επίσημα διαπιστωθεί, σύμφωνα με την APRD, η ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα για τέσσερα είδη κουνουπιών: *Aedes albopictus*, *Anopheles maculipennis*, *Anopheles sacharovi* και *Culex ripiens*. Οι πρώτες αναφορές για ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα καταγράφηκαν για είδη ανωφελών κουνουπιών στα οργανοχλωριομένα εντομοκτόνα DDT και dieldrin κατά την αρχή ήδη του ανθελονοσιακού αγώνα (Livadas and Georgopoulos, 1953). Το 2017, διαπιστώθηκε ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα και για τους πληθυσμούς των *Aedes albopictus* (Pichler et al., 2019). Ωστόσο, ανθεκτικότητα έχει αναφερθεί σε άλλα μέρη της γης και για άλλα είδη κουνουπιών τα οποία απαντώνται στην Ελλάδα, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη προϋποθέσεων ανάπτυξης ανθεκτικότητας και στη χώρα μας για τους πληθυσμούς των ειδών αυτών.

Ο αντίκτυπος του φαινομένου της ανθεκτικότητας είναι διττός από τοξικολογική άποψη. Αρχικά, η χρήση χημικών εντομοκτόνων για την καταπολέμηση εντόμων-εχθρών έχει οδηγήσει σε εφαρμογή ενός μεγάλου αριθμού, συχνά πολύ τοξικών, χημικών ουσιών στο περιβάλλον, προκαλώντας σοβαρά προβλήματα ρύπανσης τις τελευταίες δεκαετίες. Δεύτερον, η άμεση ανθρώπινη αντίδραση στην ανθεκτικότητα είναι η αύξηση της δοσολογίας, με αποτέλεσμα την επιδείνωση του προβλήματος της ανθεκτικότητας, την περαιτέρω επιβάρυνση του περιβάλλοντος και την παράλληλη αύξηση του κόστους παραγωγής (Feyereisen, 1995).

Σήμερα, έχουν αναπτυχθεί και συνεχίζουν να αναπτύσσονται αρκετές μέθοδοι (βιοχημικές, μοριακές) για την έγκαιρη διάγνωση και παρακολούθηση της ανθεκτικότητας, οι οποίες αποτελούν απαραίτητες προϋποθέσεις για την αντιμετώπισή της (Βόντας et al., 2007) και αποτελούν αναπόσπαστο μέρος των προγραμμάτων διαχείρισης των κουνουπιών. Η διαχείριση της ανθεκτικότητας εστιάζεται στον περιορισμό της επιλεκτικής πίεσης των εντομοκτόνων. Αυτό επιτυγχάνεται με τη ρύθμιση της δόσης του εντομοκτόνου, του αριθμού των πραγματοποιούμενων επεμβάσεων για τη διατήρηση των ευαίσθητων αλληλομόρφων, τη χρήση εντομοκτόνων χαμηλής υπολειμματικής διάρκειας, τη χρήση συνεργιστικών ουσιών (ενζυμικοί παρεμποδιστές που απενεργοποιούν ομάδες της βιοχημικής άμυνας), την εφαρμογή τοπικών επεμβάσεων, τη διατήρηση καταφυγίων για τα έντομα στόχους και την -με επιστημονική βάση- εναλλαγή εντομοκτόνων (Βόντας et al., 2007).

1.3.2.2. Περιβαλλοντικοί περιορισμοί

Πολλά από τα μέσα που σήμερα χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση του προβλήματος των κουνουπιών εγείρουν μια σειρά από περιβαλλοντικές ανησυχίες, οι οποίες στο κατώφλι του 21ου αιώνα αποκτούν όλο και μεγαλύτερη βαρύτητα και εμβέλεια. Η ρύπανση του εδάφους και των υδάτων, οι οικοτοξικολογικές τους επιπτώσεις, καθώς και η διαταραχή της ισορροπίας των φυσικών οικοσυστημάτων αποτελούν μερικές από αυτές.

Τα χημικά βιοκτόνα, τα οποία έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί κατά τα τελευταία χρόνια μεταξύ άλλων και για την καταπολέμηση των κουνουπιών, έχουν οδηγήσει σε σημαντικά επίπεδα περιβαλλοντικής ρύπανσης σε παγκόσμιο επίπεδο με πολύπλοκες οικοτοξικολογικές επιπτώσεις. Η αποτελεσματικότητά τους έναντι των εντόμων-στόχων μεγάλης υγειονομικής ή/και οικονομικής σημασίας, η ανάπτυξη ανθεκτικότητας των εντόμων σε αυτά, οι ελλειπείς γνώσεις για τις μακροπρόθεσμες επιπτώσεις τους, καθώς και η έλλειψη περιβαλλοντικής συνείδησης από τους χρήστες οδήγησαν κατά την διάρκεια των περασμένων δεκαετιών στην υπέρμετρη και αλόγιστη χρήση των ουσιών αυτών. Οι οικοτοξικολογικές επιπτώσεις της χρήσης αυτής επέφεραν ως άμεσο αντίκτυπο στα οικοσυστήματα τη θανάτωση ή μείωση της ευρωστίας των οργανισμών μη-στόχων και ως έμμεσο το φαινόμενο της βιοσυσσώρευσής τους στην τροφική αλυσίδα.

Στο πλαίσιο της χημικής καταπολέμησης των κουνουπιών, το οργανοχλωριωμένο εντομοκτόνο DDT (*p,p*-Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane), το οποίο είχε ευρέως χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν, αποτελεί ακόμα και σήμερα πεδίο αντιπαράθεσης των επιστημόνων. Το DDT παρασκευάστηκε το 1874 από τον Othmar Zeidler, ενώ η ανακάλυψη των εντομοκτόνων ιδιοτήτων του έγινε 65 χρόνια αργότερα από τον Paul Hermann Müller.



Εικόνα 1.3. «Οι μεγάλες προσδοκίες για το DDT έχουν επιβεβαιωθεί», λεπτομέρεια διαφήμισης των χημικών Pennsalt στο περιοδικό Time, Ιούνιος 30, 1947.

Το DDT γνώρισε άμεση ραγδαία εξάπλωση και εξαιτίας της υψηλής αποτελεσματικότητάς του, του χαμηλού κόστους παραγωγής του και της ευκολίας στην εφαρμογή του χρησιμοποιήθηκε ευρύτατα τόσο στη γεωργία, όσο και για υγειονομικές επεμβάσεις για την καταπολέμηση της ελονοσίας, του τύφου και άλλων παρασιτικών ασθενειών (West and Campbell, 1946). Η συμβολή του DDT στην καταπολέμηση των επιδημιών και παρασιτικών ασθενειών που μάστιζαν επί αιώνες την ανθρωπότητα, οδήγησε το 1948 στην απονομή στον Paul Hermann Müller του βραβείου Νόμπελ Φυσιολογίας και Ιατρικής. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας από το 1955 άρχισε να μελετά τη χρήση του DDT για την καταπολέμηση της ελονοσίας σε όλο τον κόσμο (International Development Advisory Board, 1956). Ενώ αρχικές έρευνες δεν έδειξαν υψηλά επίπεδα τοξικότητας του DDT στον άνθρωπο και στα ζώα, κατά τις επόμενες δεκαετίες εμφανίσθηκαν οι επιπτώσεις της βιοσυσσώρευσής του στο περιβάλλον. Από τις πρώτες περιβαλλοντικές επιπτώσεις του DDT ήταν η μείωση των πληθυσμών αρπακτικών πουλιών (γεράκια, αετοί, κ.λπ.) και η λέπτυνση του κελύφους των ωών διαφόρων πτηνών με αποτέλεσμα την πρόωρη εκκόλαψη και θανάτωση των νεοσσών (Ratcliffe, 1967; Davison and Shell, 1974; Lundholm, 1987). Οι παρατηρήσεις αυτές σε συνδυασμό με νεότερα επιστημονικά δεδομένα που αποδεικνύουν τη βιοσυσσώρευση του DDT σε πληθυσμούς ζώων (ακόμη και σε απομακρυσμένες περιοχές), στους λιπαρούς ιστούς των ανθρώπων, το μητρικό γάλα κ.λπ. οδήγησαν στην απαγόρευση της χρήσης του (Βαλαβανίδης, 2007). Σήμερα, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας συνεχίζει να προτείνει τη χρήση του, αποκλειστικά για έκτακτες περιστάσεις, στην καταπολέμηση της ελονοσίας (WHO, 2011).



Εικόνα 1.4. Κώνωψ ο ανωφελής κατά τη στιγμή "άντλησης αίματος". Υπάρχουν περίπου 430 είδη, από τα οποία τα 30-40 μεταδίδουν την ελονοσία. Το DDT δρα ανοίγοντας τους διαύλους νατρίου των νευρικών κυττάρων των εντόμων. Αυτό προκαλεί στο έντομο σπασμούς και τελικά το θάνατο. Ωστόσο, ορισμένες μεταλλάξεις στο γονίδιο που σχετίζεται με τις διαύλους νατρίου, είχαν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία εντόμων ανθεκτικών στο DDT (Πηγή: CDC).

Τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα, που χρησιμοποιήθηκαν μαζικά για την καταπολέμηση των κουνουπιών στη διάρκεια των περασμένων δεκαετιών, αντικαταστάθηκαν σταδιακά από τα λιγότερο σταθερά οργανοφωσφορικά, τα οποία ωστόσο εμφανίζουν υψηλότερη τοξικότητα στα σπονδυλωτά (Becker et al., 2010). Λόγω της υψηλής τοξικότητας και της ανάπτυξης ανθεκτικότητας των κουνουπιών σε αυτά, ο ΠΟΥ ενθάρρυνε την έρευνα για την αναζήτηση εναλλακτικών ουσιών για τον παρασιτικό έλεγχο (WHO, 1976). Τα καρβαμιδικά εντομοκτόνα, που αρχικά χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία έναντι των κουνουπιών τα οποία είχαν αναπτύξει ανθεκτικότητα στα οργανοχλωριωμένα και τα οργανοφωσφορικά, σήμερα εμφανίζουν παρόμοιες τοξικολογικές επιπτώσεις με αυτές των οργανοφωσφορικών (Silberman and Taylor, 2019). Η ομάδα των πυρεθρινοειδών, εμφανίζει υψηλή βιοαποικοδομησιμότητα, αλλά οδήγησε στην άμεση ανάπτυξη ανθεκτικότητας των εντόμων σε αυτά (Becker et al., 2010).

Όσον αφορά την επίδραση των εντομοκτόνων στην υγεία του ανθρώπου, η ανησυχία των επιστημόνων επικεντρώνεται, κυρίως, στις πιθανές υποχρόνιες και χρόνιες τοξικολογικές επιπτώσεις τους. Για τα θέματα αυτά υπάρχει εκτενής βιβλιογραφία, η οποία συνδέει την έκθεση στα εντομοκτόνα με χρόνια προβλήματα υγείας όπως αναπνευστικά προβλήματα, δερματολογικές παθήσεις, νευρολογικές και ενδοκρινικές διαταραχές, προβλήματα ανάπτυξης και αναπαραγωγής, καρκίνο, αλλά και γενετικές ανωμαλίες. Έτσι, σύμφωνα με τις αρχές του Διεθνούς Κέντρου Έρευνας για τον Καρκίνο (International Agency for Research on Cancer, IARC) το DDT κατατάσσεται στην κατηγορία 2Α των δυνητικά καρκινογόνων ουσιών (IARC, 2018). Η εντατική χρήση των οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών εντομοκτόνων στις αναπτυσσόμενες χώρες εκτιμάται ότι ευθύνεται ετησίως για περίπου 200.000 θανάτους (Silberman and Taylor, 2019). Οι επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου, λόγω της έκθεσης στα βιοκτόνα εξαρτάται από έναν αριθμό παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης της κατηγορίας των φαρμάκων που εμπλέκονται, του τύπου και της μορφής της δραστικής ουσίας, της ποσότητας των ουσιών, του τρόπου πρόσληψης, του χρόνου έκθεσης και της υπολειμματικότητας της δόσης.

Η παρατηρούμενη μείωση των εντόμων σε παγκόσμιο επίπεδο αποτελεί ένα ακόμα θέμα που έχει συσχετιστεί με την εντατική χρήση βιοκτόνων και απασχολεί τα τελευταία χρόνια την επιστημονική κοινότητα. Σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε από το 1989 έως το 2016, συλλέχθηκαν δείγματα εντόμων σε 96 μοναδικές τοποθεσίες προστατευόμενων περιοχών της Γερμανίας (Hallman et al., 2017). Κατά τη διάρκεια της 27ετούς διεξαγωγής της μελέτης, η μέση βιομάζα των εντόμων που συλλέχθηκε στις εν λόγω τοποθεσίες μειώθηκε κατά

76%, με την εντονότερη πτώση (περίπου 82%) να καταγράφεται στο μέσον του καλοκαιριού. Η μελέτη επεσήμανε ότι το τοπίο και η κλιματική αλλαγή είναι απίθανο να θεωρούνται υπεύθυνες για μια τέτοια σοβαρή παρακμή, τονίζοντας ότι στη μείωση αυτή εμπλέκονται παράγοντες μεγάλης κλίμακας, υποδεικνύοντας την εντατικοποίηση της γεωργίας ως πιθανό αίτιο. Τα αποτελέσματα αυτά, σε συνδυασμό με πρόσφατα αναφερθείσες μειώσεις της αφθονίας, αλλά και του αριθμού ειδών ωφέλιμων εντόμων, όπως οι πεταλούδες (Habel et al., 2015; Thomas, 2016) και οι άγριες μέλισσες (Winfree et al., 2009; Potts et al., 2010), είναι ιδιαίτερα ανησυχητικά εάν ληφθούν υπ' όψιν οι συνέπειες στα οικοσυστήματα και τις οικοσυστημικές υπηρεσίες.

Ένας επιπλέον παράγοντας διατάραξης της ισορροπίας των φυσικών οικοσυστημάτων είναι η εισαγωγή ξενικών ειδών. Η ανθρωπογενής αυτή παρέμβαση, με στόχο τη βιολογική αντιμετώπιση εντόμων-εχθρών όπως τα κουνούπια, έχει επίσης επιφέρει δυσμενείς επιπτώσεις στο φυσικό περιβάλλον και αποτελεί πεδίο αντιπαράθεσης των επιστημόνων. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα μιας τέτοιας παρέμβασης υπήρξε η εισαγωγή στις αρχές του 20ου αιώνα σε πολλά μέρη της γης του προνυμοφάγου ιχθύδιου *Gambusia affinis*, με στόχο την βιολογική αντιμετώπιση των ανωφελών κουνουπιών. Το είδος αυτό είναι ιθαγενές των γλυκών υδάτων στις νοτιοανατολικές Η.Π.Α. και πλέον συμπεριλαμβάνεται στα 100 περισσότερο χωροκατακτητικά είδη παγκοσμίως (Lowe, 2000). Γενικά, για τη θήρευση των κουνουπιών δεν θεωρείται περισσότερο αποτελεσματικό από τα ιθαγενή είδη, ενώ παράλληλα τρέφεται με τα αυγά ιχθύων οικονομικής σημασίας, αλλά και με σπάνια ιθαγενή είδη ιχθύων και ασπόνδυλων (Mills et al, 2004). Ο έλεγχος της περαιτέρω εξάπλωσής του αποτελεί σήμερα βασικό στόχο για τον περιορισμό των επιπτώσεων της εισαγωγής του στα οικοσυστήματα. Όσον αφορά τους μικροβιακούς παράγοντες οι οποίοι έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο των κουνουπιών, οι μελέτες παρακολούθησης της εφαρμογής τους στα φυσικά συστήματα δείχνουν ότι ενώ οι επιπτώσεις τους σε οργανισμούς μη στόχους δεν είναι μηδαμινές, είναι περιβαλλοντικά ασφαλείς σε σύγκριση με άλλες μεθόδους καταπολέμησης (O'Callaghan and Brownbridge, 2009).

Αξίζει να αναφερθεί η ανησυχία της επιστημονικής κοινότητας για τις επιπτώσεις της απελευθέρωσης στα οικοσυστήματα ποικίλων γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (ΓΤΟ). Πέραν των οικονομικών, κοινωνικών και ηθικών πτυχών που συνεπάγεται η παρέμβαση αυτή, κρίνεται απαραίτητη η αξιολόγηση και των οικολογικών της επιπτώσεων. Αυτή είναι ιδιαίτερα δύσκολη, λαμβάνοντας υπ' όψιν την πολυπλοκότητα των οικοσυστημάτων και τη μη προβλέψιμη συμπεριφορά των ΓΤΟ σε αυτά. Συγκεκριμένα, η ελευθέρωση ΓΤΚ με την τεχνική RIDL (βλ σελ. 43, Γενετικός Έλεγχος), ενέχει περιβαλλοντικούς κινδύνους που αφορούν στη διατάραξη της τροφικής αλυσίδας η οποία μπορεί να προκληθεί από τη μείωση συγκεκριμένων

πληθυσμών κουνουπιών (WHO, 2014). Παράλληλα, η ελευθέρωση στο περιβάλλον ΓΤΚ με αντιπαρασιτικά γονίδια ενέχει κινδύνους που αφορούν στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας των παρασίτων σε αυτά, με τον κίνδυνο να γίνει δυσκολότερη η καταπολέμηση των εξελιγμένων παρασίτων (WHO, 2014). Επιπλέον, οι στοχευμένοι πληθυσμοί κουνουπιών ενδέχεται να καταστούν περισσότερο ευάλωτοι σε άλλους παρασιτικούς οργανισμούς, οι οποίοι μπορεί να είναι παθογόνοι στον άνθρωπο. Ένας επιπλέον κίνδυνος της τεχνικής αυτής σχετίζεται με τη μεταφορά των συστημάτων καθοδήγησης γονιδίων (gene drive systems) στο γονιδίωμα άλλων ειδών, μέσω της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων με απρόβλεπτες συνέπειες για τα οικοσυστήματα και τον άνθρωπο (WHO, 2014). Οι Scott et al. (2002) υποστηρίζουν ότι, υπό ορισμένες προϋποθέσεις, η τεχνολογία των γενετικά τροποποιημένων κουνουπιών αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη μέθοδο καταπολέμησης σοβαρών παρασιτικών ασθενειών, η οποία όμως απαιτεί μακροχρόνιους πειραματισμούς πεδίου για να εκτιμηθούν οι οικολογικές της επιπτώσεις.

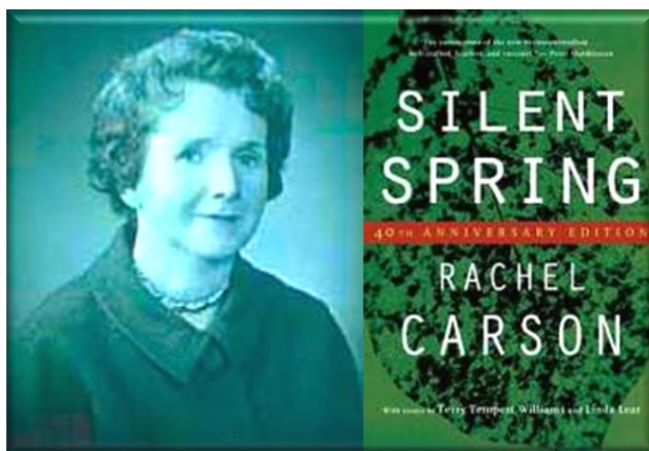
Συμπερασματικά, η μακροχρόνια εφαρμογή των συνθετικών εντομοκτόνων για την αντιμετώπιση του προβλήματος των κουνουπιών και των παρασιτικών νόσων που αυτά μεταδίδουν, καθώς και ορισμένες πιο σύγχρονες επεμβάσεις βιολογικού και γενετικού ελέγχου, έχει αποδειχθεί πως οδηγούν σε διαταραχή των ισορροπιών και των δομών των φυσικών οικοσυστημάτων με άμεσο ή έμμεσο αντίκτυπο στον άνθρωπο. Η ανάπτυξη νέων σύγχρονων μεθόδων παρασιτικού ελέγχου και η εκτίμηση των επιδράσεών τους στη φύση απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή, λαμβάνοντας υπ' όψιν τις πολυσύνθετες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των εμβίων και αβιογενών παραγόντων των φυσικών οικοσυστημάτων. Για το λόγο αυτό, η ανάπτυξη αποτελεσματικών, αλλά και φιλικών προς το περιβάλλον και τον άνθρωπο μέσων αντιμετώπισης των κουνουπιών βρίσκεται σήμερα στο προσκήνιο της έρευνας για την αντιμετώπιση εντόμων υγειονομικής σημασίας.

1.3.2.3. Κοινωνικοί – Ηθικοί - Νομοθετικοί περιορισμοί

Οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις που έχει επιφέρει η αλόγιστη χρήση των συνθετικών βιοκτόνων, μαζί με άλλες επεμβάσεις που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο των κουνουπιών, όπως η εισαγωγή ξενικών ειδών και η ελευθέρωση στο περιβάλλον γενετικά τροποποιημένων οργανισμών, έχουν οδηγήσει στην εκδήλωση μαζικών κοινωνικών κινητοποιήσεων, στην εμφάνιση περιβαλλοντικών πολιτικών και στην ανάπτυξη ενός αυστηρού νομοθετικού πλαισίου, με αποτέλεσμα σήμερα να έχει περιοριστεί και να ελέγχεται σημαντικά η εφαρμογή τους.

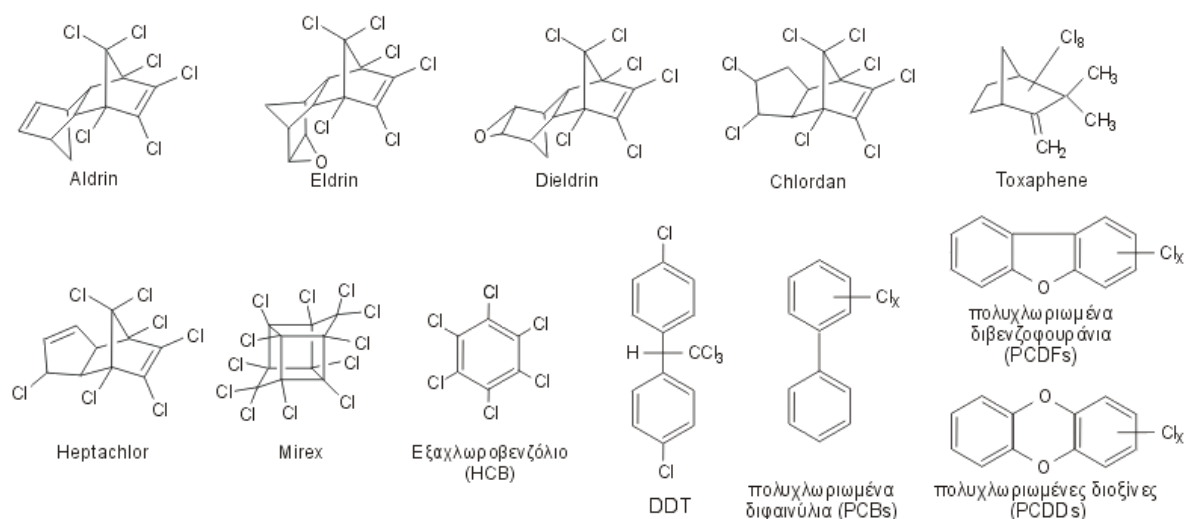
Ανάμεσα στα λεγόμενα “νέα κοινωνικά κινήματα”, τα οποία έκαναν την εμφάνισή τους μετά τα καταστροφικά χρόνια του Β' Παγκοσμίου Πολέμου, αναδύθηκε και το σύγχρονο περιβαλλοντικό κίνημα. Από τα τέλη της δεκαετίας του '50, η επερχόμενη οικολογική κρίση της οποίας τα σημάδια ήταν ήδη φανερά (καταστροφή βιοτόπων, εξαφάνιση ειδών, ρύπανση, υπερπληθυσμός κ.ά.) (Δρακάκη, 1999), έστρεψε σημαντική μερίδα επιστημόνων στην καταγγελία της ανάπτυξης και στην προειδοποίηση ότι ο πλανήτης συνολικά πρόκειται να αντιμετωπίσει κρίση βιωσιμότητας (Παπαϊωάννου, 1999).

Σταθμό στην ιστορία του σύγχρονου περιβαλλοντικού κινήματος αποτέλεσε το περίφημο βιβλίο της Αμερικανίδας βιολόγου Rachel Carson “Σιωπηλή Άνοιξη” (Carson, 1962). Στο βιβλίο της, η Carson περιέγραψε τις καταστροφές στο περιβάλλον από τη χρήση των συνθετικών εντομοκτόνων, συμβάλλοντας στη διαμόρφωση μιας νέας οικολογικής συνείδησης (Καστοριάδης, 1993). Ήταν η πρώτη φορά που επισημάνθηκε ότι η εκτεταμένη χρήση των διαδεδομένων φαρμάκων της εποχής, όπως το DDT, δεν ήταν πλέον αποτελεσματική ενάντια στα έντομα και οδηγεί σταδιακά στην ανοσοποίηση των οργανισμών, ενώ, παράλληλα, έχει σημαντικές επιπτώσεις σε οργανισμούς μη στόχους και το περιβάλλον, αφήνοντας το ενδεχόμενο μιας οικολογικής καταστροφής ανοιχτό. Ενώ η κυκλοφορία της “Σιωπηλής Άνοιξης” συνοδεύτηκε από πλήθος θετικών, και αρνητικών, κριτικών από την επιστημονική κοινότητα, τελικά το έργο αυτό αναγνωρίστηκε ευρέως ως ο θεμελιώδης λίθος της σύγχρονης οικολογίας. Ενθάρρυνε την περαιτέρω έρευνα για τους κινδύνους από τη χρήση εντομοκτόνων, έπαιξε σημαντικό ρόλο για αλλαγές στη σχετική νομοθεσία, ενθάρρυνε το δημόσιο διάλογο για τις περιβαλλοντικές πρακτικές, ενέπνευσε τη νεότερη γενιά ακτιβιστών και καθιέρωσε τον όρο οικολογία στο καθημερινό λεξιλόγιο των ανθρώπων.



Εικόνα 1.5. Η “Σιωπηλή Άνοιξη” (1962) της Αμερικανίδας βιολόγου Rachel Carson.

Στο πλαίσιο των κοινωνικών κινητοποιήσεων και νομοθετικών ρυθμίσεων για το περιβάλλον που διαμορφώθηκαν το δεύτερο μισό του 20ου αιώνα, η χρήση των χημικών βιοκτόνων αμφισβητήθηκε και ελέγχθηκε σημαντικά. Οι βιομηχανικές χώρες άρχισαν να περιορίζουν την εφαρμογή των οργανοχλωριωμένων βιοκτόνων, μέχρι την απαγόρευση της παραγωγής τους και την επιβολή ορίων για την παρουσία τους ως ευρέως διαδεδομένους ρυπαντές του νερού και των τροφίμων. Αργότερα, μία διεθνής περιβαλλοντική συνθήκη, η Σύμβαση της Στοκχόλμης για τους Έμμονους Οργανικούς Ρύπους (POPs), υπεγράφη το 2001, τέθηκε σε ισχύ το Μάιο του 2004 και τροποποιήθηκε το 2009 και το 2011 με την προσθήκη ορισμένων προϊόντων είχε ως στόχο την εξάλειψη ή τον περιορισμό της παραγωγής και χρήσης ορισμένων έμμονων οργανικών ρύπων. Από τις ενώσεις που συμπεριλήφθηκαν στη Συμφωνία της Στοκχόλμης, γνωστές ως η «βρώμικη δωδεκάδα», οι 8 χρησιμοποιούνταν σε βιοκτόνα προϊόντα.



Σχήμα 1.4. Η «βρώμικη δωδεκάδα» που προέκυψε από τη Σύμβαση της Στοκχόλμης.

Ενώ οι περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες και ορισμένες από εκείνες που έχουν εμπορικές σχέσεις μαζί τους, στην πράξη συμμορφώθηκαν με τη σύμβαση, εντούτοις η παραγωγή, χρήση και αποθήκευσή τους δεν διεκόπη, λόγω του χαμηλού κόστους και της αποδεκτής αποτελεσματικότητας ορισμένων δραστικών ουσιών των οποίων η χρήση εξακολουθεί να υφίσταται, σε πολύ μικρότερη κλίμακα (Mrema et al, 2012; Damalas, 2009).

Στην Ευρώπη, ο έλεγχος των βιοκτόνων ουσιαστικά ξεκίνησε το 1993 με την εφαρμογή της Οδηγίας 91/414/ΕΟΚ για την έγκριση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Αυτή είχε ως στόχο τον έλεγχο σχεδόν των 1.000 δραστικών ουσιών που περιείχονταν σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα τα οποία κυκλοφορούσαν έως τότε στην Ευρωπαϊκή αγορά. Σύμφωνα με την Οδηγία, για να χρησιμοποιηθεί μία δραστική ουσία σε φυτοπροστατευτικό προϊόν θα πρέπει να βρίσκεται στη “θετική” λίστα της Ε.Ε. Από το 1993, έχει καταργηθεί από

την αγορά πάνω από το 50% των δραστικών ουσιών που χρησιμοποιούνταν σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα (Hillocks, 2012). Στη συνέχεια, η ανάγκη για διαχείριση του κινδύνου των μη γεωργικών παρασιτοκτόνων οδήγησε στην έγκριση της Οδηγίας 98/8/ΕΟΚ για τα βιοκτόνα, η οποία αργότερα αντικαταστάθηκε με τον Κανονισμό 528/2012 που θεσμοθετεί τους όρους και τις προϋποθέσεις που πρέπει να πληρούνται ώστε να καταστεί δυνατή η διάθεση των βιοκτόνων στην Ευρωπαϊκή αγορά και να είναι ασφαλής η χρήση τους. Παράλληλα, στο πλαίσιο μιας νέας σειράς νομοθετικών μέτρων της Ε.Ε., αποκαλούμενα “το πακέτο για τα φυτοφάρμακα”, που περιλαμβάνουν δύο Οδηγίες (2009/127/ΕΟΚ, 2009/128/ΕΟΚ) και δύο Κανονισμούς (1107/2009, 185/2009), εισάγεται η έννοια της “ολοκληρωμένης διαχείρισης επιβλαβών οργανισμών” (Integrated Pest Management, IPM) (Barzman et al., 2015), η οποία, αν και αναφέρεται στην προστασία των καλλιεργειών, ενθαρρύνει τη χρήση εναλλακτικών μεθόδων διαχείρισης έναντι των συνθετικών βιοκτόνων και αποτελεί πρότυπο για εφαρμογή αντίστοιχων στρατηγικών και σε άλλους τομείς της οικονομίας, αλλά και της δημόσιας υγείας.

Παράλληλα, η αλματώδης ανάπτυξη της βιολογίας στη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών οδήγησε στην ανάπτυξη ενός νέου κλάδου, της Βιοηθικής, η οποία διερευνά τα ηθικά ερωτήματα που σχετίζονται με τις καινοτόμες εφαρμογές της βιοτεχνολογίας. Υπό το νέο αυτό πρίσμα, η τεχνολογία των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (ΓΤΟ) αμφισβητήθηκε τόσο από την επιστημονική κοινότητα, όσο και από το ευρύτερο κοινωνικό σύνολο. Τα πρώτα όρια στον τομέα της γενετικής μηχανικής τέθηκαν σε μια συνάντηση εκατό μοριακών βιολόγων στην Καλιφόρνια το 1975 (Berg, 2008), ενώ την επόμενη χρονιά συγκροτήθηκε στην Αμερική ειδική Συμβουλευτική Επιτροπή, η οποία είχε ως ρόλο τη θέσπιση κανόνων για τη διεξαγωγή πειραμάτων γενετικής μηχανικής. Σήμερα, η νομοθεσία για τους ΓΤΟ και τα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα (ΓΤΤ) είναι αρκετά αυστηρή, παρ’ ότι διαφέρει από χώρα σε χώρα. Επιπλέον, μεγάλοι διεθνείς οργανισμοί, συνασπισμοί και ενώσεις κρατών, επιτροπές και κοινωνικές ομάδες έχουν ως στόχο την ουσιαστική ενημέρωση του ευρύτερου κοινού, την πρόκληση διαλόγου και την κατάθεση τεκμηριωμένων απόψεων για τους ΓΤΟ.

Η αμφισβήτηση της χρήσης της γενετικής μηχανικής για τον έλεγχο των κουνουπιών ξεκίνησε το 1970, όταν ένα διεθνές επιστημονικό πρόγραμμα που θα αξιολογούσε τις δυνατότητες διαφόρων γενετικών τεχνικών στην Ινδία, διεκόπη όταν κατηγορήθηκε από μία ομάδα τοπικών δημοσιογράφων και πολιτικών ότι λειτουργούσε ως βιτρίνα έρευνας για βιολογικά όπλα που χρηματοδοτείτο από τις ΗΠΑ (Curtis, 2007). Πιο πρόσφατα, έντονες αντιδράσεις προκλήθηκαν τόσο από την επιστημονική κοινότητα, όσο και από το ευρύτερο κοινωνικό σύνολο για τις δοκιμές μαζικής ελευθέρωσης ΓΤΚ (Γενετικά Τροποποιημένων

Κουνουπιών) που πραγματοποιήθηκαν από την εταιρεία Oxitec Ltd στα νησιά Cayman, τη Μαλαισία, τον Παναμά και τη Βραζιλία. Στις δοκιμές αυτές αντέδρασαν πολλοί επιστήμονες υποστηρίζοντας ότι απαιτούνταν περαιτέρω μελέτες για πιθανές επιδράσεις των ΓΤΚ στο περιβάλλον και τη δημόσια υγεία προ της μαζικής απελευθέρωσής τους (Enserink, 2011). Άλλοι, εξέφρασαν την ανησυχία τους για τον κοινωνικό αντίκτυπο της ελευθέρωσης των ΓΤΚ χωρίς την απαιτούμενη κοινωνική συναίνεση και ρυθμιστική εποπτεία (Pollack, 2011). Αντίστοιχες δοκιμές πεδίου που προτάθηκαν σε ορισμένα διοικητικά διαμερίσματα της Καλιφόρνια, δεν προχώρησαν εξαιτίας κοινωνικών αντιδράσεων (Resnik, 2018). Έτσι, υπό το πρίσμα της ανάπτυξης της τεχνολογίας των ΓΤΟ για την ολοκληρωμένη διαχείριση φορέων, κρίνεται απαραίτητη η αποσαφήνιση ορισμένων ηθικών, νομικών και κοινωνικών ζητημάτων, όπως η εκτίμηση και διαχείριση των κινδύνων για τη δημόσια υγεία και το περιβάλλον, η κοινοτική διαβούλευση, η συναίνεση και ρυθμιστική εποπτεία των αρμόδιων αρχών (Resnik, 2018).

1.3.2.4. Οικονομικοί περιορισμοί

Ένας ακόμα σημαντικός περιοριστικός παράγοντας στην αντιμετώπιση των κουνουπιών και των νόσων που μεταδίδουν είναι το υψηλό κόστος της παραγωγής/ανάπτυξης, αλλά και της παρακολούθησης των σύγχρονων μεθόδων που εφαρμόζονται. Συγκεκριμένα, οι περιβαλλοντικοί, κοινωνικοί, ηθικοί και νομοθετικοί περιορισμοί που έχουν τεθεί ωθούν προς τη διενέργεια έρευνας για την ανακάλυψη νέων, αποτελεσματικών, και περιβαλλοντικά ασφαλών μεθόδων αντιμετώπισης των κουνουπιών, αλλά και προς τη διαρκή παρακολούθηση των αναπτυσσόμενων μεθόδων εκτίμησης της αποτελεσματικότητας και των δυνητικών περιβαλλοντικών τους επιδράσεων. Το υψηλό κόστος για την έρευνα, παραγωγή και παρακολούθηση των μεθόδων αυτών, σε συνδυασμό με τους περιορισμένους οικονομικούς πόρους των χωρών που εμφανίζουν τον υψηλότερο υγειονομικό κίνδυνο από κουνούπια-φορείς, καθιστά πολλές από αυτές μη αποτελεσματικές (Paul et al., 2006).

Παρά τις προσπάθειες του ακαδημαϊκού χώρου, της βιομηχανίας των βιοκτόνων και των εθνικών και διεθνών προγραμμάτων, η ανακάλυψη νέων συνθετικών εντομοκτόνων παραμένει μια ιδιαίτερα δαπανηρή και αργή διαδικασία. Παρ' ότι έχουν ανακαλυφθεί ορισμένες νέες κατηγορίες συνθετικών εντομοκτόνων για γεωργική χρήση, ουδεμία έχει κυκλοφορήσει στην αγορά τις τελευταίες τρεις δεκαετίες για την καταπολέμηση των κουνουπιών (Becker et al., 2010; Weeks et al., 2018). Τα αίτια είναι πολύπλοκα, με κύριο την έλλειψη ισχυρών εμπορικών κινήτρων (περιορισμένη αγορά για τη δημόσια υγεία και τη διαχείριση φορέων) και τον εγγενή οικονομικό κίνδυνο που συνοδεύει την ανάπτυξη νέων

εντομοκτόνων. Αυτά αποτελούν ισχυρό αποτρεπτικό παράγοντα για να επενδύσει ο ιδιωτικός τομέας στην έρευνα και την παραγωγή τους. Το σημερινό κόστος για την ανάπτυξη και έγκριση ενός νέου συνθετικού εντομοκτόνου εκτιμάται περί τα 100-150 εκατομμύρια δολάρια ΗΠΑ (USD), ενώ το κόστος για την ανάπτυξη ενός νέου προϊόντος από ένα υπάρχον εντομοκτόνο ανέρχεται στα 4-6 εκατομμύρια δολάρια ΗΠΑ (USD) (Becker et al., 2010). Ένας ακόμα σημαντικός αποτρεπτικός παράγοντας είναι ο χρόνος ανάπτυξης ενός νέου εντομοκτόνου που κυμαίνεται στα 10-12 χρόνια για την πρώτη περίπτωση και τα 4-6 για τη δεύτερη (Becker et al., 2010). Άμεσο οικονομικό αντίκτυπο έχει το πρόβλημα της ανάπτυξης ανθεκτικότητας των κουνουπιών στα συνθετικά εντομοκτόνα, η οποία οδηγεί σε μια συνεχή αναζήτηση για νέα αποτελεσματικά προϊόντα, ενώ συγχρόνως απαιτεί την ανάπτυξη τεχνικών και στρατηγικών για την έγκαιρη διάγνωση, παρακολούθηση και αντιμετώπισή της.

Πολλές παρεμβάσεις για την περιβαλλοντική διαχείριση των κουνουπιών με στόχο τη μείωση των εστιών ανάπτυξής τους, όπως για παράδειγμα οι αποξηράνσεις ελών και κατασκευές φραγμάτων, έχουν συνήθως υψηλό κόστος. Ωστόσο, τα οφέλη τους φαίνονται μακροπρόθεσμα με αποτέλεσμα το κόστος της αρχικής επένδυσης να είναι συγκρίσιμο με τις δαπάνες που προορίζονται για την καταπολέμηση των κουνουπιών σε μακροχρόνια βάση (WHO, 1982). Όσον αφορά την καταπολέμηση των προνυμφών με τη χρήση μικροβιακών παραγόντων, ενώ παρουσιάζει υψηλή αποτελεσματικότητα και μηδαμινές περιβαλλοντικές επιπτώσεις, το κόστος της ανάπτυξης και παραγωγής τέτοιων μικροβίων είναι συνήθως υψηλό (Poopathi and Archana, 2012). Στην περίπτωση του Bti (*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*), ενώ το κόστος της παραγωγής του εξαρτάται από ένα σύνολο παραγόντων, το μέσον της καλλιέργειας αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα κριτήρια, που ανέρχεται στο 70% του κόστους παραγωγής (Ejiofor, 1991). Έτσι, η ανεύρεση οικονομικά αποτελεσματικών πρώτων υλών ως μέσα καλλιέργειας μικροβιακών παραγόντων, με σκοπό την ανάπτυξη μικροβιακών προνυμφοκτόνων σκευασμάτων, βρίσκεται σήμερα στο προσκήνιο της έρευνας του βιολογικού ελέγχου.

Η εφαρμογή καινοτόμων τεχνικών γενετικού ελέγχου για την αντιμετώπιση των κουνουπιών, κυρίως των Γενετικά Τροποποιημένων Κουνουπιών (ΓΤΚ) και των συμβιωτικών βακτηρίων *Wolbachia*, απαρτίζεται από τα τρία παρακάτω μέρη μεγάλης οικονομικής βαρύτητας: 1) το τεχνικό μέρος, που περιλαμβάνει την έρευνα και ανάπτυξη της τεχνολογίας ΓΤΚ και την υλοποίησή της, 2) τη ρυθμιστική διαδικασία, που αφορά την έγκριση της βιοασφάλειας για την απελευθέρωση των ΓΤΚ και, τέλος, 3) την κοινωνική συναίνεση, η οποία απαιτεί την οργάνωση εκπαιδευτικών προγραμμάτων και εκστρατειών ενημέρωσης για τα κουνούπια-φορείς και τη νέα τεχνολογία (Undurraga et al., 2016). Η οικονομική αξιολόγηση των στρατηγικών αυτών είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη, με αποτέλεσμα πολλά οικονομικά στοιχεία

που σχετίζονται με την παραγωγή, ελευθέρωση και παρακολούθηση των ΓΤΚ να είναι εν πολλοίς άγνωστα (Alphey, 2014). Η οικονομική ανάλυση των μεθόδων αυτών, περιλαμβάνει εκτός από την εκτίμηση του κόστους υλοποίησής τους και το συνυπολογισμό των δυνητικών οικονομικών ωφελειών μετά από επιτυχή εφαρμογή τους. Σύμφωνα με οικονομική ανάλυση για τις στρατηγικές χρησιμοποίησης των ΓΤΚ για τον έλεγχο του Δάγκειου πυρετού, εκτιμάται ότι αυτές θα ήταν οικονομικά συμφέρουσες μόνο σε περιοχές με υψηλή μετάδοση του DENV, με εν εξελίξει εντατικά προγράμματα διαχείρισης φορέων και υψηλό κατά κεφαλήν εισόδημα (Undurraga et al., 2016).

Ο οικονομικός παράγοντας, επομένως, παρουσιάζει μεγάλη πολυπλοκότητα και κρίνεται ως ιδιαίτερα σημαντικός για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας μιας μεθόδου για την αντιμετώπιση των κουνουπιών. Η χρήση των συνθετικών βιοκτόνων, αλλά και οι πιο σύγχρονες μέθοδοι βιολογικής αντιμετώπισης και γενετικού ελέγχου των κουνουπιών-φορέων ασθενειών παρουσιάζουν σημαντικούς οικονομικούς περιορισμούς, οι οποίοι οδηγούν στη συνεχή αναζήτηση οικονομικά αποτελεσματικότερων λύσεων.

1.3.3. Τα αιθέρια έλαια στην αντιμετώπιση των κουνουπιών

Εξαιτίας των αλληλένδετων φυσικών, περιβαλλοντικών, κοινωνικών, νομοθετικών και οικονομικών περιορισμών που εμφανίζουν πολλές σύγχρονες μέθοδοι αντιμετώπισης των κουνουπιών, είναι σκόπιμη η ανεύρεση νέων εναλλακτικών, οικονομικών και “περιβαλλοντικά ασφαλών” μέσων για την ολοκληρωμένη διαχείρισή τους. Στο πλαίσιο αυτό, τα φυσικά προϊόντα αποτελούν ένα ελπιδοφόρο και πολύτιμο όπλο στη φαρέτρα των εναλλακτικών μεθόδων που διατίθενται για την ολοκληρωμένη αντιμετώπιση των εντόμων και ειδικότερα των κουνουπιών. Η μελέτη των βιολογικών ιδιοτήτων προϊόντων μικροβιακής και φυτικής προέλευσης, καθώς και προϊόντων πράσινης νανοτεχνολογίας βρίσκεται τη στιγμή αυτή στο προσκήνιο της έρευνας για την αντιμετώπιση εντόμων-φορέων (Benelli and Pavea, 2018a).

Ανάμεσα στην πληθώρα των φυσικών βιοκτόνων που έχουν έως τώρα μελετηθεί, τα αιθέρια έλαια αποτελούν μία ενδιαφέρουσα επιλογή για την αντιμετώπιση των κουνουπιών, καθώς εμφανίζουν τα παρακάτω πλεονεκτήματα: α) ως προϊόντα φυτικής προέλευσης συνάδουν με την αυξανόμενη απαίτηση του κοινού για τη χρησιμοποίηση φυσικών προϊόντων, β) ως συνέπεια της συνεξέλιξής τους με τους άγριους επικονιαστές των φυτών, εμφανίζουν συμβατότητα η οποία ελαχιστοποιεί τις ανεπιθύμητες σε αυτούς παρενέργειες, γ) είναι βιοδιασπώμενα και επομένως εμφανίζουν χαμηλή υπολειμματικότητα στα οικοσυστήματα και μηδενική βιοσυσσωρευση κατά μήκος της τροφικής αλυσίδας, δ) η φυσική ποικιλότητα των συστατικών τους, καθώς και η πρόκληση τοξικότητας στα έντομα μέσω ποικίλων μηχανισμών

δράσης αποτρέπουν την ανάπτυξη ανθεκτικότητας των εντόμων σε αυτά (Rattan, 2010; Miresmailli and Isman, 2014) και ε) εμφανίζουν εντομοαπωθητική και προνυμφοκτόνο δράση έναντι πολλών διαφορετικών ειδών.

Ως συνέπεια, μία πληθώρα αιθερίων ελαίων έχει μελετηθεί για την τοξικότητά τους έναντι των κουνουπιών. Στόχος είναι ο πληθυσμιακός τους έλεγχος και η ατομική προστασία από τα νύγματα τους. Τα αιθέρια έλαια εμφανίζουν βιολογική δράση σε ένα ευρύ φάσμα εντόμων-εχθρών. Ο τρόπος εφαρμογής τους ποικίλει αφού δρουν στα έντομα: ως υποκαπνιστικά (fumigants), ως εντομοκτόνα επαφής (contact insecticides), ως απωθητικά (repellents), ως ανασχετικά λήψης τροφής (antifeedants), ως ρυθμιστές ανάπτυξης (IGR's), ως παρεμποδιστές της αναπαραγωγής-ωοτοκίας (Parachristos and Stamopoulos, 2002; Parachristos et al., 2004, Isman, 2006; Regnault-Roger et al., 2012). Ωστόσο, παρά τις προοπτικές τους ως δυνητικά δραστικά συστατικά για την ανάπτυξη βοτανικών βιοκτόνων, λίγα είναι τα εμπορικά διαθέσιμα βιοκτόνα προϊόντα με βάση τα αιθέρια έλαια (Pavela and Benelli, 2016). Τα αιθέρια έλαια έχουν έως τώρα αξιοποιηθεί κυρίως για την ατομική προστασία από τα νύγματα των κουνουπιών μέσω της ανάπτυξης εντομοαπωθητικών προϊόντων που εφαρμόζονται απ' ευθείας στο γυμνό δέρμα, σε προστατευτικά ενδύματα και κουνουπιέρες, αλλά και εντομοαπωθητικών χώρου σε αρωματικά κεριά και σκευάσματα για ψεκασμούς επιφανειών. Αντίθετα, οι εξ ίσου διεξοδικά μελετημένες προνυμφοκτόνες ιδιότητες, αλλά και άλλες βιολογικές δράσεις των αιθερίων ελαίων έναντι των κουνουπιών, δεν έχουν ακόμα αξιοποιηθεί εμπορικά.

1.3.2.1. Ατομική προστασία

Τα μέτρα ατομικής προστασίας εναντίον των νυγμάτων των κουνουπιών, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης απωθητικών ουσιών, χρησιμοποιούνται ευρύτατα στις μέρες μας για την μείωση της όχλησης από τα κουνούπια, αλλά και την προστασία από ασθένειες που μεταδίδονται από αυτά (Fradin and Day, 2002). Η μέθοδος, ωστόσο, της απώθησης οχλητικών εντόμων δεν αποτελεί μοντέρνα πρακτική. Μία από τις πρώτες καταγραφές για τη χρήση εντομοαπωθητικών προέρχεται από τον ιστορικό Ηρόδοτο (Paluch et al., 2010), ο οποίος αναφέρεται στην καύση φυτικών τμημάτων για την απώθηση των μυγών. Πριν από την ανάπτυξη της συνθετικής χημείας, τα μηχανικά μέσα και τα φυτικά εκχυλίσματα αποτελούσαν τα κύρια μέσα προστασίας από τα νύγματα των εντόμων. Ανάμεσα στα πρώτα φυτικά εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν με αποτελεσματικότητα για την απώθηση των κουνουπιών ήταν τα αιθέρια έλαια από κίτρο, κάσσια, κέδρο, λεβάντα, ευκάλυπτο και αζαδιράχτη (Bacot and Talbot, 1919; Bunker and Hirschfelder, 1925).

Κατά τη διάρκεια του Δευτέρου Παγκοσμίου Πολέμου μελετήθηκαν περισσότερες από 6000 χημικές ενώσεις ως προς την εντομοαπωθητική τους δράση. Ανεξάρτητες μελέτες οδήγησαν στην ανακάλυψη το 1953, του N,N-diethyl-3-methylbenzamide (Deet), που ακόμα και σήμερα θεωρείται ως μία από τις αποτελεσματικότερες συνθετικές απωθητικές ουσίες εναντίον των κουνουπιών και αποκαλείται ως η «χρυσή πρότυπη» (“gold standard”) εντομοαπωθητική ουσία μεταξύ των κυκλοφορούντων στην αγορά (Fradin, 1998). Ωστόσο, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις πρόκλησης νευροτοξικότητας, δερματίτιδας και αλλεργικών αντιδράσεων από τη χρήση του Deet, κυρίως σε μικρά παιδιά και ηλικιωμένους (Clem et al., 1993; Qiu et al., 1998; Sudakin and Trevathan; 2003; Corbel et al., 2009), αυξάνοντας την απαίτηση των καταναλωτών για την ανάπτυξη εναλλακτικών εντομο-απωθητικών ουσιών φυσικής προέλευσης (natural products).

Τα τελευταία χρόνια ένας μεγάλος αριθμός αιθερίων ελαίων που προέρχονται από διαφορετικές φυτικές οικογένειες έχει αξιολογηθεί για την απωθητική τους δράση έναντι των εντόμων και ειδικότερα των υγειονομικής σημασίας κουνουπιών. Οι κυριότερες οικογένειες φυτών που έχουν μελετηθεί ως πηγές απωθητικών κουνουπιών είναι οι: Lamiaceae, Poaceae, Rutaceae, Myrtaceae, Zingiberaceae, Asteraceae, Lauraceae και Apiaceae (Nerio et al., 2010; Kalita et al., 2013). Σήμερα, τα εμπορικά διαθέσιμα βοτανικά απωθητικά περιέχουν αιθέρια έλαια προερχόμενα κυρίως από τα είδη *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon excavatus*, *Corymbia maculata*, *Corymbia citriodora*, *Mentha piperita*, *Juniperus virginiana*, *Nepeta cataria*, *Pelargonium reniforme* και *Azadirachta indica* (Carroll and Loye, 2006; Nerio et al., 2010; Kalita et al., 2013).

Ειδικότερα, τα γένη *Cymbopogon* (Poaceae), *Eucalyptus* (Myrtaceae) και *Ocimum* (Lamiaceae) έχουν μελετηθεί διεξοδικά για την εντομο-απωθητική τους δράση (Nerio et al., 2010). Είδη του γένους *Cymbopogon* έχουν χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά για την απώθηση των κουνουπιών στις ζούγκλες του Αμαζονίου (Βολιβία) (Moore et al., 2007) και παράγουν τα πλέον χρησιμοποιούμενα εντομο-απωθητικά στον κόσμο (Trongtokit et al., 2005). Ως ιδιαίτερα αποτελεσματικά απωθητικά κουνουπιών έχουν επίσης αξιολογηθεί και βρει ευρεία εφαρμογή πολλά αιθέρια έλαια του γένους *Eucalyptus*, (Nerio et al., 2010), αλλά και του είδους *Corymbia citriodora* (syn. *Eucalyptus maculata* var. *citriodora*) (Carroll and Loye, 2006; Jaenson et al., 2006). Εκτός από τα παραπάνω είδη, κάθε χρόνο δημοσιεύεται ένας ολοένα αυξανόμενος αριθμός μελετών για την απωθητική δράση ποικίλων αιθερίων ελαίων έναντι των κουνουπιών, έχοντας αναδείξει ως εναλλακτικές πηγές νέων φυσικών απωθητικών πολλά επιπλέον φυτικά είδη. Τα κυριότερα από αυτά συνοψίζονται στον **Πίνακα 1.3.1**.

Πίνακας 1.3.1. Αιθέρια έλαια με ισχυρή απωθητική δράση έναντι των κουνουπιών.

| Αιθέρια Έλαια | | Κουνούπι -στόχος | |
|--|------------|---|--|
| Φυτικό Είδος | Οικογένεια | Είδος | Αναφορά |
| <i>Cymbopogon excavatus</i> | Poaceae | <i>Anopheles arabiensis</i> | Govere et al. (2000b) |
| <i>Cymbopogon citratus</i> | Poaceae | <i>Anopheles arabiensis</i> <i>Culex quinquefasciatus</i> <i>Aedes aegypti</i> <i>Anopheles dirus</i> | Karunamoorthi and Murugan (2010), Solomon et al. (2012) Pushpanathan et al. (2006) Sritabutra et al. (2011) |
| <i>Cymbopogon nardus</i> | Poaceae | <i>Aedes aegypti</i> <i>Anopheles arabiensis</i> | Fradin and Day (2002), Trongtokit et al. (2005), Siriporn and Mayura (2010) Solomon et al. (2012) |
| <i>Cymbopogon winterianus</i> | Poaceae | <i>Aedes aegypti</i> <i>Culex quinquefasciatus</i> <i>Anopheles dirus</i> | Tawatsin et al. (2001) |
| <i>Cymbopogon martinii martinii</i> | Poaceae | <i>Anopheles culicidacies</i> <i>Culex quinquefasciatus</i> | Ansari and Razdan (1994) |
| <i>Eucalyptus nitens</i> | Myrtaceae | <i>Aedes aegypti</i> <i>Aedes albopictus</i> | Alvarez Costa (2017) |
| <i>Eucalyptus globulus</i> | Myrtaceae | <i>Aedes albopictus</i> <i>Aedes aegypti</i> <i>Anopheles dirus</i> <i>Anopheles stephensi</i> | Yang and Ma (2005) Sritabutra et al. (2011) Barat Shooshtari et al. (2013) |
| <i>Eucalyptus tereticornis</i> | Myrtaceae | <i>Culex quinquefasciatus</i> | Pujiarti and Fentiyanti, (2017) |
| <i>Eucalyptus deglupta</i> | Myrtaceae | <i>Culex quinquefasciatus</i> | Pujiarti and Fentiyanti, (2017) |
| <i>Eucalyptus camaldulensis</i> | Myrtaceae | <i>Culex pipiens</i> | Erlar et al. (2006). |
| <i>Corymbia citriodora subsp. citriodora</i> | Myrtaceae | <i>Anopheles arabiensis</i> <i>Aedes aegypti</i> <i>Anopheles stephensi</i> | Govere et al. (2000a), Fradin and Day (2002), Solomon et al. (2012) Trongtokit et al. (2005) |
| <i>Melaleuca leucadendron</i> | Myrtaceae | <i>Anopheles stephensi</i> <i>Aedes aegypti</i> <i>Culex quinquefasciatus</i> | Amer and Mehlhorn (2006a) Amer and Mehlhorn (2006a), Noosidum et al. (2008) Noosidum et al. (2008) |
| <i>Melaleuca quinquenervia</i> | Myrtaceae | <i>Anopheles stephensi</i> <i>Aedes aegypti</i> <i>Culex quinquefasciatus</i> | Amer and Mehlhorn (2006a) |
| <i>Syzygium aromaticum</i> | Myrtaceae | <i>Aedes aegypti</i> <i>Anopheles albimanus</i> | Barnard (1999), Trongtokit et al. (2005), Siriporn and Mayura (2010), Sritabutra et al. (2011) Barnard (1999) |
| <i>Ocimum basilicum</i> | Lamiaceae | <i>Aedes aegypti</i> <i>Anopheles dirus</i> <i>Culex quinquefasciatus</i> <i>Anopheles stephensi</i> <i>Culex pipiens</i> | Prajapati et al. (2005), Sritabutra et al. (2011) Sritabutra et al. (2011) Trongtokit et al. (2005), Erlar et al (2006) Prajapati et al. (2005) |

| | | | |
|--------------------------------|-----------|--|--|
| | | | Erlar et al. (2006) |
| <i>Ocimum americanum</i> | Lamiaceae | <i>Aedes aegypti</i> , <i>Culex quinquefasciatus</i> <i>Anopheles dirus</i> | Tawatsin et al. (2001) Kazembe and Chaibva (2012) |
| <i>Ocimum selloi</i> | Lamiaceae | <i>Anopheles braziliensis</i> | Padilha de Paula (2003) |
| <i>Mentha piperita</i> | Lamiaceae | <i>Anopheles annularis</i> <i>Anopheles culicifacies</i> <i>Culex quinquefasciatus</i> <i>Aedes aegypti</i> <i>Culex pipiens</i> | Ansari et al. (2000) Kumar et al. (2011), Sritabutra et al. (2011) Erlar et al. (2006) |
| <i>Mentha spicata</i> | Lamiaceae | <i>Aedes albopictus</i> | Giatropoulos et al. (2018) |
| <i>Pogostemon cablin</i> | Lamiaceae | <i>Anopheles gambiae</i> <i>Anopheles stephensi</i> <i>Aedes aegypti</i> <i>Culex quinquefasciatus</i> | Omolo et al. (2004) Omolo et al. (2004), Trongtokit et al. (2005) Trongtokit et al. (2005), Gokulakrishnan et al. (2013) |
| <i>Thymus vulgaris</i> | Lamiaceae | <i>Aedes aegypti</i> <i>Anopheles albimanus</i> <i>Culex pipiens</i> <i>Aedes albopictus</i> | Barnard (1999) Park et al. (2005) Giatropoulos et al. (2018) |
| <i>Rosmarinus officinalis</i> | Lamiaceae | <i>Culex tritaeniorhynchus</i> <i>Anopheles stephensi</i> <i>Aedes aegypti</i> <i>Culex quinquefasciatus</i> <i>Aedes albopictus</i> | Govindarajan (2011) Prajapati et al. (2005), Barat Shooshtari and Galandari (2012), Barat Shooshtari et al. (2013) Prajapati et al. (2005), Gillij et al. (2008) Prajapati et al. (2005) Giatropoulos et al. (2018) |
| <i>Lavand ula officinalis</i> | Lamiaceae | <i>Anopheles stephensi</i> | Barat Shooshtari et al. (2013) |
| <i>Lavand ula angustifolia</i> | Lamiaceae | <i>Anopheles stephensi</i> | Barat Shooshtari and Galandari (2012) |
| <i>Origanum dictamnus</i> | Lamiaceae | <i>Aedes albopictus</i> | Giatropoulos et al. (2018) |
| <i>Origanum mantzurianum</i> | Lamiaceae | <i>Aedes albopictus</i> | Giatropoulos et al. (2018) |
| <i>Satureja thymbra</i> | Lamiaceae | <i>Aedes albopictus</i> | Giatropoulos et al. (2018) |
| <i>Mellisa officinalis</i> | Lamiaceae | <i>Aedes albopictus</i> <i>Anopheles stephensi</i> | Giatropoulos et al. (2018) Oshaghi et al. (2003), Barat Shooshtari and Galandari (2012), Barat Shooshtari et al. (2013) |
| <i>Vitex negundo</i> | Lamiaceae | <i>Aedes aegypti</i> | Hebbalkar et al. (1992), Karunamoorthi et al. (2008) |
| <i>Nepeta cataria</i> | Lamiaceae | <i>Aedes aegypti</i> <i>Anopheles stephensi</i> <i>Culex quinquefasciatus</i> <i>Anopheles gambiae</i> | Amer and Mehlhorn (2006a) Amer and Mehlhorn (2006a) Amer and Mehlhorn (2006a), Birkett et al. (2011) Birkett et al. (2011) |
| <i>Zanthoxylum armatum</i> | Rutaceae | <i>Aedes aegypti</i> | Kwon et al. (2011) |
| <i>Zanthoxylum piperitum</i> | Rutaceae | <i>Culex quinquefasciatus</i> <i>Aedes aegypti</i> <i>Aedes gardnerii</i> <i>Anopheles sinensis</i> | Trongtokit et al. (2005) Trongtokit et al. (2005), Kwon et al. (2011) Kwon et al. (2011) |

| | | | |
|--------------------------------|---------------|---|---|
| | | <i>Anopheles pullus</i> <i>Aedes vexans</i> <i>Anopheles barbirostris</i> <i>Armigeres subalbatus</i> <i>Culex tritaeniorhynchus</i> <i>Culex gelidus</i> <i>Culex vishnui</i> <i>Mansonia uniformis</i> | Kamsuk et al. (2007) |
| <i>Zanthoxylum limonella</i> | Rutaceae | <i>Culex quinquefasciatus</i> <i>Aedes aegypti</i> <i>Aedes albopictus</i> | Trongtokit et al. (2005) Das et al. (2015) |
| <i>Citrus sinensis</i> | Rutaceae | <i>Aedes aegypti</i> <i>Culex quinquefasciatus</i> <i>Anopheles stephensi</i> <i>Anopheles dirus</i> | Siriporn and Mayura (2010), Phasomkusolsil and Soonwera (2011), Murugan et al. (2012) Siriporn and Mayura (2010), Phasomkusolsil and Soonwera (2011), Murugan et al. (2012) Murugan et al. (2012) Phasomkusolsil and Soonwera (2011) |
| <i>Citrus limon</i> | Rutaceae | <i>Anopheles stephensi</i> <i>Aedes aegypti</i> <i>Aedes albopictus</i> | Oshaghi et al. (2003) Kazembe and Chaibva (2012) Giatropoulos et al. (2012) |
| <i>Citrus aurantifolia</i> | Rutaceae | <i>Aedes aegypti</i> <i>Culex quinquefasciatus</i> | Soonwera (2015) |
| <i>Citrus hystrix</i> | Rutaceae | <i>Aedes aegypti</i> <i>Culex quinquefasciatus</i> <i>Anopheles dirus</i> | Tawatsin et al. (2001) |
| <i>Zingiber officinale</i> | Zingiberaceae | <i>Culex quinquefasciatus</i> <i>Aedes aegypti</i> <i>Culex tritaeniorhynchus</i> <i>Anopheles subpictus</i> <i>Anopheles stephensi</i> | Pushpanathan et al. (2008), Khandagle et al. (2011) Prajapati et al. (2005), Khandagle et al. (2011) Govindarajan (2011) Prajapati et al. (2005) |
| <i>Curcuma longa</i> | Zingiberaceae | <i>Aedes aegypti</i> <i>Culex quinquefasciatus</i> <i>Anopheles dirus</i> <i>Aedes albopictus</i> | Tawatsin et al. (2001), Siriporn and Mayura (2010) Tawatsin et al. (2001), Siriporn and Mayura (2010) Tawatsin et al. (2001) Das et al. (2015) |
| <i>Curcuma aromatica</i> | Zingiberaceae | <i>Aedes togoi</i> <i>Armigeres subalbatus</i> <i>Culex quinquefasciatus</i> <i>Culex tritaeniorhynchus</i> | Pitasawat et al. (2003) |
| <i>Conyza newii</i> | Asteraceae | <i>Anopheles gambiae</i> | Omolo et al. (2004) |
| <i>Tarhnanthus camphoratus</i> | Asteraceae | <i>Anopheles gambiae</i> | Omolo et al. (2004) |
| <i>Cinnamomum zeylanicum</i> | Lauraceae | <i>Anopheles stephensi</i> <i>Aedes aegypti</i> <i>Culex quinquefasciatus</i> <i>Culex tritaeniorhynchus</i> | Prajapati et al. (2005) Govindarajan (2011) |
| <i>Cinnamomum camphora</i> | Lauraceae | <i>Anopheles stephensi</i> | Brown (2005) |
| <i>Laurus nobilis</i> | Lauraceae | <i>Culex pipiens</i> | Traboulsi et al. (2005), Erler et al. (2006) |

| | | | |
|---------------------------------|--------------|---|---|
| <i>Litsea cubeba</i> | Lauraceae | <i>Anopheles stephensi</i> <i>Aedes aegypti</i> <i>Culex quinquefasciatus</i> | Amer and Mehlhorn (2006a) Amer and Mehlhorn (2006a), Noosidum et al. (2008) Noosidum et al. (2008) |
| <i>Litsea salicifolia</i> | Lauraceae | <i>Aedes aegypti</i> <i>Culex quinquefasciatus</i> | Phukan and Kalita (2005), Noosidum et al. (2008) Phukan and Kalita (2005) |
| <i>Pimpinella anisum</i> | Apiaceae | <i>Culex pipiens</i> | Erler et al. (2006) |
| <i>Foeniculum vulgare</i> | Apiaceae | <i>Culex pipiens molestus</i> | Traboulsi et al. (2005) |
| <i>Apium graveolens</i> | Apiaceae | <i>Armigeres sp.</i> <i>Culex sp.</i> <i>Mansonia sp.</i> | Tuetun et al. (2009) |
| <i>Azadirachta indica</i> | Meliaceae | <i>Anopheles stephensi</i> | Paterson (2009) |
| <i>Juniperus procera</i> | Cupressaceae | <i>Anopheles arabiensis</i> | Karunamoorthi et al. (2014) |
| <i>Juniperus communis</i> | Cupressaceae | <i>Aedes aegypti</i> <i>Culex quinquefasciatus</i> | Carroll et al. (2011) Amer and Mehlhorn (2006a) |
| <i>Juniperus virginiana</i> | Cupressaceae | <i>Culex quinquefasciatus</i> | Amer and Mehlhorn (2006a) |
| <i>Cupressus funebris</i> | Cupressaceae | <i>Aedes aegypti</i> | Trongtokit et al. (2005) |
| <i>Cupressus macrocarpa</i> | Cupressaceae | <i>Aedes albopictus</i> | Giatropoulos et al. (2012) |
| <i>Cupressus benthamii</i> | Cupressaceae | <i>Aedes albopictus</i> | Giatropoulos et al. (2012) |
| <i>Chamaecyparis lawsoniana</i> | Cupressaceae | <i>Aedes albopictus</i> | Giatropoulos et al. (2012) |
| <i>Tetraclinis articulata</i> | Cupressaceae | <i>Aedes albopictus</i> | Giatropoulos et al. (2012) |
| <i>Pinus halepensis</i> | Pinaceae | <i>Aedes albopictus</i> | Koutsaviti et al. (2014) |
| <i>Pinus brutia</i> | Pinaceae | <i>Aedes albopictus</i> | Koutsaviti et al. (2014) |
| <i>Pinus stankeviczii</i> | Pinaceae | <i>Aedes albopictus</i> | Koutsaviti et al. (2014) |
| <i>Viola odorata</i> | Violaceae | <i>Anopheles stephensi</i> <i>Aedes aegypti</i> <i>Culex quinquefasciatus</i> | Amer and Mehlhorn (2006a) |
| <i>Lippia javanica</i> | Verbenaceae | <i>Aedes aegypti</i> <i>Anopheles gambiae</i> | Nzira et al. (2009) Omolo et al. (2004) |
| <i>Lantana camara</i> | Verbenaceae | <i>Aedes aegypti</i> <i>Aedes vittatus</i> <i>Aedes albopictus</i> | Dua et al. (1996) Dua et al. (2003) |

Η εντομο-απωθητική δράση των παραπάνω αιθερίων ελαίων έχει αποδοθεί στο περιεχόμενό τους κυρίως σε μονοτερπένια και σесκιτερπένια (Nerio et al., 2010). Εξ αυτών, τα μονοτερπένια α -πινένιο, κινεόλη, *cis*-καρβεόλη, ευγενόλη, γερανιόλη, λεμονένιο, περιλυλ-αλκοόλη, περυλαλδεΰδη, τερπινολένιο, μυρκένιο, 3-καρένιο, κιτρονελάλη, καμφορά, *cis*-βερμπενόλη, καρβακρόλη και θυμόλη αναφέρονται συχνά στη βιβλιογραφία ως υπεύθυνα για την απωθητική δράση πολλών αιθερίων ελαίων έναντι των κουνουπιών (Ibrahim και Zaki, 1998; Jaenson et al., 2006; Yang et al., 2004; Omolo et al. 2004; Park et al., 2005; Odalo et al., 2005). Επίσης, από τα σесκιτερπένια, το β -καρνοφυλλένιο και το οξειδίο του καρνοφυλλενίου εμφανίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές ως ισχυρά απωθητικά έναντι των ειδών *Aedes aegypti* και *Anopheles gambiae* (Omolo et al., 2004; Odalo et al., 2005; Gillij et al., 2008). Η

φυτόλη, μία αλλειφατική διτερπενική αλκοόλη, αναφέρεται ότι εμφανίζει ισχυρή απωθητική δράση κατά του *Anopheles gambiae* (Odaló et al., 2005).

Η ένωση π-μενθανο-3,8-διόλη (*p*-menthane-3,8-diol, PMD) αποτελεί το πρώτο βιοδραστικό συστατικό που προέρχεται από το αιθέριο έλαιο των φύλλων του *Corymbia citriodora* και έχει επίσημα αναγνωριστεί από το Κέντρο Ελέγχου Ασθενειών και Πρόληψης (Centers for Disease Control, CDC) ως απωθητικό φυσικής προέλευσης (CDC, 2005; Carroll and Loye, 2006). Συγκεκριμένα, το φυσικό απωθητικό Citriodiol®, που έχει εγκριθεί από τον Οργανισμό Προστασίας του Περιβάλλοντος (EPA Reg. No. 84878-3) και συμπεριληφθεί στην Ευρωπαϊκή Οδηγία για τα βιοκτόνα (98/8/EK), προέρχεται από επεξεργασία του αιθερίου ελαίου των φύλλων του δέντρου *Corymbia citriodora* με στόχο την αύξηση της συγκέντρωσης της PMD στο 65% του τελικού αιθερίου ελαίου.

Παρ' ότι η εντομο-απωθητική δράση των αιθερίων ελαίων συνήθως αποδίδεται σε συγκεκριμένες ενώσεις, το φαινόμενο της συνέργειας μεταξύ αυτών (ή των μεταβολιτών τους) μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερη βιοδραστικότητα σε σύγκριση με αυτήν των μεμονωμένων συστατικών (Hummelbrunner and Isman, 2001; Gillij et al., 2008). Μελέτες που συγκρίνουν την απωθητική δράση των αιθερίων ελαίων με μίγματα των κύριων συστατικών τους, έδειξαν ότι σε πολλές περιπτώσεις η δράση των συνθετικών μιγμάτων ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με των αντίστοιχων ελαίων (Omolo et al., 2004). Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι ακόμα και τα συστατικά που βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στα αιθέρια έλαια, συμβάλλουν στην εντομο-απωθητική τους δράση και τονίζουν τη σημασία της χημικής ποικιλότητας των αιθερίων ελαίων για τη βιοδραστικότητά τους. Έτσι, συνάγεται ότι οι ουσίες που βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις μπορεί να λειτουργούν συνεργιστικά, ενισχύοντας τη δράση των κύριων συστατικών.

Η συνεργιστική δράση των συστατικών των αιθερίων ελαίων έχει επίσης φανεί από την ισχυρή εντομο-απωθητική δράση των διαφορετικών μιγμάτων τους. Ο Liu και οι συνεργάτες του (2006) απέδειξαν ότι το μίγμα των αιθερίων ελαίων των ειδών *Artemisia princeps* και *Cinnamomum camphora* εμφανίζει ισχυρότερη εντομο-απωθητική δράση σε σύγκριση με τα μεμονωμένα έλαια, προτείνοντας ότι η συνέργεια μεταξύ των κύριων συστατικών τους οδηγεί σε υψηλότερη βιοδραστικότητα. Άλλη μελέτη που εξέταζε την απωθητική δράση των αιθερίων ελαίων των ειδών *Curcuma longa*, *Pogostemon heyneanus* και *Zanthoxylum limonella*, καθώς και των διαφορετικών συνδυασμών τους έναντι του είδους *Aedes albopictus*, έδειξε ότι ο συνδυασμός *C. longa* - *Z. limonella* (1:1) και ο συνδυασμός των τριών (*C. longa* - *Z. Limonella* - *P. heyneanus*, 1:1:2) εμφανίζουν τη μεγαλύτερη διάρκεια πλήρους προστασίας (Complete Protection Time, CPT), χωρίς ωστόσο να εμφανίζουν σημαντική διαφορά μεταξύ τους (Das et

al., 2015). Σε πείραμα πεδίου χρησιμοποιήθηκε και συνδυασμός των τριών ελαίων, προσδίδοντας ακόμα μεγαλύτερη διάρκεια πλήρους προστασίας για διαφορετικά είδη κουνουπιών (Das et al., 2015). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι ο συνδυασμός διαφορετικών ελαίων μπορεί να αυξήσει τόσο την τοξική τους δράση όσο και το χρόνο προστασίας από τα νύγματα των κουνουπιών.

Ενώ τα αιθέρια έλαια μπορεί να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά ως απωθητικά την ώρα της εφαρμογής τους, η προστατευτική τους διάρκεια είναι συνήθως περιορισμένη, λόγω της υψηλής πτητικότητάς τους (Trongtokit et al., 2005). Για να ξεπεραστεί το μειονέκτημα αυτό, έχουν εφαρμοστεί ποικίλες μέθοδοι για την ενίσχυση της απωθητικής τους δράσης και την αύξηση της εμπορικής τους αξίας. Μερικές από αυτές αναφέρονται στη χρήση παρασκευασμάτων βασισμένων σε αλοιφές, μίγματα πολυμερών και μικροκάψουλες, σταθεροποιητικά υλικά, καθώς και σε συνδυασμό απωθητικών ουσιών/μιγμάτων (Nerio et al., 2010). Η πλέον διαδεδομένη έως σήμερα μέθοδος είναι ο συνδυασμός των αιθερίων ελαίων με κατάλληλη αναλογία βανιλίνης (Auysawasdi et al., 2105; Kwon et al., 2014; Kim et al., 2012; Choochote et al., 2007; Kamsuk et al., 2006; Yang and Ma, 2005). Ο εγκλεισμός των αιθερίων ελαίων (ή των μιγμάτων τους) σε μικρο-κάψουλες, με τη χρήση φυσικών ή συνθετικών πολυμερών που στοχεύει στην ελεγχόμενη απελευθέρωσή τους στο περιβάλλον, αποτελεί μία νέα υπό εξέλιξη τεχνολογία με υποσχόμενα έως τώρα αποτελέσματα (Rodríguez et al., 2016). Για το σκοπό αυτό έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία πολυμερή ζελατίνης (Moretti et al., 2002; Maji et al., 2007; Solomon et al., 2012), σύμπλοκα κυτοζάνης-ζελατίνης (Maji et al., 2008), ζελατίνης-αραβικού κόμμεως (Specos et al., 2010), καθώς και πορώδη σφαιρίδια κυτταρίνης (porous cellulose beads, Viscopearl) (Kim et al., 2012; Kim et al., 2019). Ένα νέο πεδίο έρευνας με προοπτικές για την ενίσχυση της δράσης των βοτανικών βιοκτόνων είναι η πράσινη σύνθεση νανοσωματιδίων (Benelli, 2016). Όμως, αν και η χρησιμοποίηση νανοσωματιδίων φορτωμένων με αιθέρια έλαια (ή μεμονωμένα συστατικά τους) παρουσιάζει ελπιδοφόρα αποτελέσματα ως βιοκτόνα, η απωθητική τους δράση δεν έχει ακόμα μελετηθεί (Benelli and Pavela, 2018b).

Συμπερασματικά, πολλά αιθέρια έλαια προερχόμενα από ένα ευρύ φάσμα της φυτικής βιοποικιλότητας, καθώς και μεμονωμένα συστατικά τους, εμφανίζουν σημαντικές προοπτικές για χρησιμοποίηση ως απωθητικά κουνουπιών. Η συνεργιστική δράση μιγμάτων των συστατικών τους, η ανάμιξή τους με σταθεροποιητικούς παράγοντες, ο εγκλεισμός τους σε μικροκάψουλες με στόχο την ελεγχόμενη απελευθέρωσή τους και η σύνθεση νανοσωματιδίων καλυμμένων με αιθέρια έλαια αποτελούν μερικά από τα υπό εξέλιξη πεδία έρευνας που

στοχεύουν στην ενίσχυση της απωθητικής δράσης και προστατευτικής διάρκειας των αιθερίων ελαίων.

1.3.2.2. Πληθυσμιακός έλεγχος

Εκτός από τα μέτρα ατομικής προστασίας, η ολοκληρωμένη αντιμετώπιση των εντόμων-διαβιβαστών, και ειδικότερα των κουνουπιών, βασίζεται στον πληθυσμιακό έλεγχο των τελείων. Για τον περιορισμό της πληθυσμιακής πυκνότητας των κουνουπιών ακολουθούνται δύο κύριες στρατηγικές: ο περιορισμός των εστιών αναπαραγωγής τους και η κατάλληλη διαχείριση των εστιών ανάπτυξης προνυμφών, κυρίως, μέσω της εφαρμογής προνυμφοκτόνων (Pavela, 2015). Ωστόσο, σήμερα οι δυσμενείς επιπτώσεις των συνθετικών προνυμφοκτόνων στο περιβάλλον, τους οργανισμούς μη-στόχους και τον άνθρωπο, καθώς και η ανάπτυξη ανθεκτικότητας των εντόμων σε αυτά, έχουν οδηγήσει στην αναζήτηση νέων εναλλακτικών στρατηγικών πληθυσμιακού ελέγχου των εντόμων-φορέων. Στο πλαίσιο αυτό, η μελέτη των αιθερίων ελαίων για την ανάπτυξη νέων, αποτελεσματικών και περιβαλλοντικά ασφαλών βοτανικών προνυμφοκτόνων, έχει αυξηθεί κατακόρυφα κατά τα τελευταία έτη.

Αναλυτικότερα, ένα φάσμα φυτικών ειδών προερχόμενο από διαφορετικές οικογένειες φυτών έχει μελετηθεί ως προς τις προνυμφοκτόνες ιδιότητες κατά των κουνουπιών των αιθερίων ελαίων που εμπεριέχουν. Σε σχετική βιβλιογραφική ανασκόπηση ο Pavela (2015) αναφέρει ότι εστίασε σε 122 φυτικά είδη (26 οικογένειες), εκ των οποίων περίπου τα 2/3 (68,8%) προέρχονται από πέντε κύριες οικογένειες φυτών: Lamiaceae (19,7%), Cupressaceae (14,7%), Rutaceae (12,3%), Apiaceae (11,5%) και Myrtaceae (10,6%). Τα κριτήρια επιλογής των αιθερίων ελαίων για να συμπεριληφθούν στην ανασκόπηση ήταν: 1) η πρόκληση επαρκούς θνησιμότητας ($LC_{50} \leq 100$ ppm) βάσει των προτύπων δοκιμών προνυμφοκτονίας (WHO, 1996, 2005) και 2) να είναι γνωστή η χημική τους σύσταση. Τα 77 από τα 122 αιθέρια έλαια εμφάνισαν $LC_{50} < 50$ ppm, ενώ είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι πολλά από αυτά αποτελούν κοινά καλλιεργούμενα αρωματικά είδη, όπως *C. sativum*, *Eucalyptus* spp., *F. vulgare*, *M. longifolia*, *O. basilicum*, *Piper* spp., *P. anisum*, *Thymus* spp., κλπ και επομένως παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα ως δυνητικές πηγές βοτανικών βιοκτόνων. Εφτά αιθέρια έλαια από τα είδη *Blumea densiflora*, *Auxemma glazioviana*, *Callitris glaucophylla*, *Cinnamomum microphyllum*, *Cinnamomum mollissimum*, *Cinnamomum rhyncophyllum*, *Zanthoxylum oxyphyllum* έχουν αξιολογηθεί ως ισχυρά προνυμφοκτόνα με $LC_{50} < 10$ ppm.

Σε αντιστοιχία με την LC_{50} , και η τιμή της LC_{90} αποτελεί μια σημαντική παράμετρο για την εκτίμηση της βιοδραστικότητας. Το μέγεθος αυτό, παρ' ότι προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για τη συγκέντρωση που απαιτείται για τη μέγιστη θνησιμότητα των προνυμφών,

σε πολλές μελέτες δεν υπολογίζεται. Ωστόσο, η σημασία του φαίνεται από τα αποτελέσματα των μελετών στις οποίες τα αιθέρια έλαια με παρόμοιες τιμές LC₅₀ παρουσίασαν σημαντική διαφορά στις αντίστοιχες τιμές LC₉₀. Για παράδειγμα, τα αιθέρια έλαια των ειδών *Satureja hortensis* και *Thymus vulgare* που εμφάνισαν συγκρίσιμες LC₅₀ (36 και 33 ppm αντίστοιχα) κατά των προνυμφών *Culex quinquefasciatus*, για το LC₉₀ παρουσίασαν σημαντικά διαφορετικές τιμές (45 και 99 ppm αντίστοιχα) (Pavela, 2009). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα δύο ξεχωριστών μελετών στις οποίες αξιολογήθηκε η προνυμφοκτόνος δράση των αιθερίων ελαίων των ειδών *Piper permucronatum* (Morais et al., 2007) και *Cinnamomum osmophloeum* (Cheng et al., 2004), αυτά παρουσίασαν όμοιες τιμές LC₅₀ (36 ppm), αλλά διαφορετικές LC₉₀ (47 και 79 ppm αντίστοιχα) κατά των προνυμφών *Aedes aegypti*. Γενικώς, η συγκέντρωση που απαιτείται για την προνυμφοκτονία εξαρτάται από ένα σύνολο παραγόντων όπως το προνυμφικό στάδιο, η θερμοκρασία περιβάλλοντος, η ικανότητα των ουσιών να διαπερνούν το κέλυφος της προνύμφης και ο μηχανισμός δράσης τους (Pavela et al., 2009; Rattan, 2010).

Ενώ πολλές μελέτες εστιάζουν στην προνυμφοκτόνο δράση των αιθερίων ελαίων, λίγες είναι οι διαθέσιμες γνώσεις για τους μηχανισμούς δράσης τους κατά των εντόμων (Pavela, 2015). Τα αιθέρια έλαια και τα συστατικά τους επηρεάζουν τις βιοχημικές διεργασίες των εντόμων διαταράσσοντας την ενδοκρινική τους ισορροπία, αφού μπορεί να διαθέτουν νευροτοξική δράση ή/και να δρουν ως ρυθμιστές ανάπτυξης παρεμβαίνοντας στη φυσιολογική διαδικασία της μορφογένεσης (Reynolds, 1987; Rattan, 2010). Τα συμπτώματα της τοξικής δράσης των δευτερογενών αυτών μεταβολιτών στα έντομα, που περιλαμβάνουν κυρίως υπερκινητικότητα, υπερδιέγερση, παράλυση, σπασμούς και θάνατο των εντόμων, υποδηλώνουν έναν νευροτοξικό μηχανισμό δράσης (Ennan, 2001). Ως οι κυριότεροι στόχοι των αιθερίων ελαίων στο νευρικό σύστημα των εντόμων αναφέρονται η ακετυλοχολινεστεράση (AChE), οι οκταπαμινεργικοί υποδοχείς, οι υποδοχείς του γ-αμινοβουτυρικού οξέως (GABA) των διαύλων χλωρίου και το μιτοχονδριακό σύστημα (Rattan, 2010).

Η ακετυλοχολινεστεράση (AChE) είναι μία εστεράση που συμμετέχει στις χολινεργικές συνάψεις, υδρολύοντας την ακετυλοχολίνη (ACh) σε χολίνη και οξικό οξύ. Η αναστολή της AChE προκαλεί συσσώρευση της ACh στις συνάψεις και ενεργοποίηση της μετασυναπτικής μεμβράνης, οδηγώντας σε κατάσταση αταξίας, γενική απώλεια προσανατολισμού του νευρομυϊκού συστήματος και τελικά στο θάνατο των εντόμων (Singh and Singh, 2000; Aygun et al., 2002). Τα αιθέρια έλαια των *Azadirachta indica*, *Mentha* spp., *Lavendula* spp. και ορισμένα συστατικά τους, όπως η λιναλοόλη και η αζαδιραχτίνη, αναφέρεται ότι παρεμποδίζουν αντιστρεπτά τη λειτουργία της AChE σε διαφορετικά είδη εντόμων (Grundy

and Still, 1985; Ryan and Byrne, 1988; Miyazawa et al., 1997; Keane and Ryan, 1999; Felipe et al., 2008).

Η οκταπαμίνη είναι μία φυσική βιογενής αμίνη, που παίζει κύριο ρόλο νευροδιαβιβαστή, νευροδιαμορφωτή και/ή νευροορμόνης στα ασπόνδυλα, παρόμοιο με αυτόν της νορεπινεφρίνης στα σπονδυλωτά (Evans, 1981). Η οξείες και υποθανάτιες επιδράσεις των αιθερίων ελαίων στη συμπεριφορά των εντόμων συνάδουν με έναν οκταπαμινεργικό μηχανισμό δράσης (Rattan, 2010). Τα αιθέρια έλαια των *Cedrus* spp., *Pinus* spp., *Citronella* spp., *Eucalyptus* spp. και ορισμένα συστατικά τους, όπως η ευγενόλη και η θυμόλη, έχουν αναφερθεί ως οκταπαμινεργικοί αγωνιστές (Kostyukovsky et al., 2002; Enan, 2005; Price and Berry, 2006). Απαιτούνται, ωστόσο, περαιτέρω μελέτες ώστε να εξακριβωθεί η εκλεκτικότητά τους στους ιστούς των εντόμων και η ακριβείς περιοχές πρόσδεσης στους αντίστοιχους υποδοχείς (Rattan, 2010).

Οι υποδοχείς του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA receptors) των διαύλων χλωρίου έχουν επίσης αποδειχθεί ως στόχοι συστατικών των αιθερίων ελαίων στα έντομα, τα οποία δρουν ανταγωνιστικά σταθεροποιώντας μη-αγώγιμες διαμορφώσεις των διαύλων χλωρίου. Η παρεμπόδιση της μετάδοσης των νευρικών σημάτων αυτής της οδού οδηγεί σε υπερδιέγερση, σπασμούς, παράλυση και στο θάνατο των εντόμων (Bloomquist, 2003). Η θυογιόνη, η θυμόλη και τα σιλφινένια έχει αναφερθεί ότι δρουν ως ανταγωνιστικοί αναστολείς των υποδοχέων GABA_A στους νευρώνες των εντόμων (Hold et al., 2000; Bloomquist, 2003; Bloomquist et al., 2008).

Η προνυμφοκτόνος δράση των αιθερίων ελαίων στα έντομα μπορεί επιπλέον να οφείλεται στην επίδρασή τους στο μιτοχονδριακό σύστημα, όπου παρεμβαίνουν στον ενεργειακό μεταβολισμό επηρεάζοντας τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών (H-ATP: αντλία πρωτονίων) ή τη λειτουργία κάποιου ενζυμικού συμπλόκου (ATPάση) (Cheng and Fu, 1989). Οι πυρεθρίνες (*Crysanthemum cinerariaefolium*) αναφέρεται ότι διαταράσσουν την ανταλλαγή των ιόντων νατρίου και καλίου στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (Casida, 1973). Η ροτενόνη (*Deris eliptica* και *Lonchocarpus* spp.) αναστέλλει τη μεταφορά ηλεκτρονίων παρεμβαίνοντας στη λειτουργία του συμπλόκου I της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Yamamoto and Kurokawa, 1970; Storey et al., 1981), ενώ η δουνιόνη αναφέρεται ότι αναστέλλει τη λειτουργία του μιτοχονδριακού συμπλόκου III (Khambay et al., 2003). Αποτέλεσμα της δράσης αυτής στα έντομα είναι η παράλυση των στοματικών μερών, ο λιμός και ο αργός θάνατος (Rattan, 2010).

Το γεγονός ότι τα αιθέρια έλαια αποτελούν σύνθετα μίγματα ποικίλων συστατικών με ένα ευρύ φάσμα, εν πολλοίς άγνωστων, μηχανισμών δράσης στα έντομα, καθυστερεί την ανάπτυξη ανθεκτικότητας των εντόμων σε αυτά (Völlinger, 1987; Schmutterer, 1988).

Επιπλέον των ποικίλων μηχανισμών δράσης που εμφανίζουν, η προνυμφοκτόνος δράση των αιθερίων ελαίων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό και από την ικανότητά τους να διαπερνούν τον εξωσκελετό των εντόμων (Pavela, 2015). Ο λιπόφιλος χαρακτήρας των ενώσεων σχετίζεται σημαντικά με την ικανότητά τους να διαπεράσουν τη δερμίδα των προνυμφών, ενώ οι διπλοί δεσμοί παίζουν, επίσης, σημαντικό ρόλο, καθώς η υδρογόνωσή τους μπορεί να μεταβάλλει τον λιπόφιλο χαρακτήρα των μορίων (Lomonaco et al., 2009).

Η διασύνδεση της προνυμφοκτόνου δράσης των αιθερίων ελαίων με τη χημική τους σύσταση είναι δύσκολη, καθώς οι αλληλεπιδράσεις (συνεργιστικές και ανταγωνιστικές) μεταξύ των διαφορετικών συστατικών μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά τη βιολογική δράση του μίγματος. Ο Pavela (2015), ωστόσο, στην ανασκόπησή του παρατήρησε ότι ορισμένα συστατικά εμφανίζονται επαναλαμβανόμενα στα αιθέρια έλαια αρκετών φυτών της ίδιας οικογένειας που εμφανίζουν προνυμφοκτόνο δράση. Έτσι, πρότεινε αυτά να θεωρηθούν αντιπροσωπευτικά της κάθε οικογένειας. Τα συστατικά που εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα στα αιθέρια έλαια των φυτών των πέντε κύριων οικογενειών με προνυμφοκτόνο δράση κατά των κουνουπιών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1.3.2**. Επιπλέον, εξετάζοντας τα αιθέρια έλαια των επτά ειδών που εμφανίζουν τιμές $LC_{50} < 10$ ppm, ο Pavela (2015) συμπέρανε ότι περιείχαν λιγότερο κοινά συστατικά που προέρχονται κυρίως από την ομάδα των σεσκιτερπενίων (γουαϊόλη, α -μπισαμπολόλη, α -καδινόλη, γερμακρένιο-D, β -καρυοφυλλένιο). Παρ' ότι τα σεσκιτερπένια φαίνεται να έχουν ισχυρότερη δράση σε σύγκριση κάποια μονοτερπένια, οι σχέσεις που διέπουν τα διαφορετικά συστατικά των πολύπλοκων μιγμάτων θα πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπ' όψιν κατά την απόδοση της βιολογικής τους δράσης. Οι διαφορετικοί μηχανισμοί δράσης των μεμονωμένων συστατικών, εάν συνδυαστούν μπορούν να ενισχύσουν όχι μόνο την προνυμφοκτόνο δράση των αιθερίων ελαίων, αλλά και να αποτρέψουν την ανάπτυξη ανθεκτικότητας των εντόμων σε αυτά (Rattan, 2010).

Πίνακας 1.3.2. Χημικά συστατικά που απαντώνται με τη μεγαλύτερη συχνότητα στα αιθέρια έλαια των κυριότερων οικογενειών με προνυμφοκτόνο δράση κατά των κουνουπιών (Pavela, 2015).

| Οικογένεια | Χημικά Συστατικά |
|-------------------|---|
| Lamiaceae | 1,8-κινεόλη, θυμόλη, π -κυμένιο |
| Cupressaceae | α -πινένιο; δ -3-καρένιο, σαμπινένιο, λεμονένιο |
| Rutaceae | λεμονένιο, α - και β -πινένιο |
| Apiaceae | λεμονένιο, α - και β -πινένιο, σαμπινένιο, <i>trans</i> -ανηθόλη |
| Myrtaceae | 1,8-κινεόλη, θυμόλη, π -κυμένιο |

Παρά τον μεγάλο αριθμό μελετών που έχουν δημοσιευθεί για τις προνυμφοκτόνες ιδιότητες των αιθερίων ελαίων, έως τώρα δεν υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα προνυμφοκτόνα προϊόντα με βάση τα αιθέρια έλαια. Αυτό οφείλεται στη(ν): 1) παραγωγή των αιθερίων ελαίων που πολλές φορές είναι ασύμφορη οικονομικά, δεδομένου ότι συχνά προέρχονται από είδη που δεν αποδίδουν μεγάλες σοδειές ή επαρκείς ποσότητες αιθερίου ελαίου, 2) χημική ποικιλότητα των αιθερίων ελαίων, η οποία επηρεάζεται από ένα σύνολο παραγόντων πέρα από τον γενετικό (εδαφο-κλιματικοί, εποχικότητα κλπ), 3) χαμηλή υπολειμματική τους διάρκεια, η οποία λόγω υψηλής πτητικότητας και ταχείας βιοαποικοδομισιμότητας μειώνει τη βιολογική δραστηριότητά τους (Isman, 2000; Stahl-Biskup and Sáes, 2002; Koulet al., 2008; Miresmailli and Isman, 2014) και 4) έλλειψη επαρκών αποτελεσμάτων από δοκιμές πεδίου (Chellappandian et al., 2018).

Το υψηλό κόστος της παραγωγής επαρκών ποσοτήτων αιθερίων ελαίων μπορεί να αντιμετωπιστεί μέσω της καλλιέργειας κατάλληλων χημειοτύπων (Stahl-Biskup and Sáes, 2002), αλλά και μέσω της εφαρμογής μικρότερων θανατηφόρων ή υποθανάτιων δόσεων των αιθερίων ελαίων. Οι επιδράσεις των δόσεων αυτών στη συμπεριφορά των ακμυαίων κουνουπιών, και ειδικά στην παρεμπόδιση της ωοτοκίας μπορεί να μειώσει σημαντικά την πληθυσμιακή τους πυκνότητα (Pavela, 2007; Pavela et al., 2009; Autran et al., 2009). Επιπλέον, η χαμηλή υπολειμματικότητα των αιθερίων ελαίων μπορεί να ξεπεραστεί μέσω της ανάπτυξης κατάλληλων μιγμάτων τους με σταθεροποιητικούς παράγοντες ή διαφορετικές μεθόδους εγκλεισμού (Dong et al., 2011; Turek and Stintzing, 2013). Είναι σημαντική η κατανόηση της συνεργιστικής δράσης των διαφόρων φυτοχημικών συστατικών για την παρασκευή κατάλληλων μιγμάτων με ενισχυμένη δράση (Hummelbrunner and Isman, 2001; Pavela, 2008, 2014; Pavela et al., 2019). Σύγχρονες βιοτεχνολογικές τεχνικές δίνουν τη δυνατότητα ανάπτυξης βοτανικών βιοκτόνων χρησιμοποιώντας χημικά συστατικά σε βέλτιστη συνεργιστική αναλογία (Pavela, 2014a,b), ενώ η πράσινη βιοτεχνολογία αποτελεί ένα ακόμα υπό εξέλιξη ερευνητικό πεδίο με προοπτικές στην ενίσχυση της δράσης των βοτανικών βιοκτόνων (Muthukumaran et al., 2015).

Συμπερασματικά, η προνυμφοκτόνος δράση των αιθερίων ελαίων έχει εκτενώς μελετηθεί και πολλά από αυτά έχει βρεθεί να εμφανίζουν σημαντικές προοπτικές για τον πληθυσμιακό έλεγχο των κουνουπιών. Όμως, η αξιοποίησή τους σε εμπορικό επίπεδο για την ανάπτυξη προνυμφοκτόνων σκευασμάτων δεν έχει προχωρήσει, εξαιτίας ενός συνόλου παραγόντων που αφορούν κυρίως τις δυσκολίες παραγωγής και τη χαμηλή υπολειμματική τους δράση. Τη στιγμή αυτή, η διερεύνηση διαφορετικών προσεγγίσεων, μεθόδων και τεχνολογιών για την ενίσχυση της βιολογικής τους δράσης, αλλά και την οικονομικότερη εκμετάλλευσή τους βρίσκονται στο προσκήνιο της έρευνας για τα πράσινα βιοκτόνα.

1.4. Τα αιθέρια έλαια της ελληνικής βιοποικιλότητας ως φυσικά βιοκτόνα

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα έως τώρα δεδομένα για τη βιολογική δράση και τις σημαντικές προοπτικές των αιθερίων ελαίων για την απόθεση ή/και τον πληθυσμιακό έλεγχο των κουνουπιών, παράλληλα με τη σημασία της αξιοποίησης της αυτοφυούς χλωρίδας για την αντιμετώπιση εντόμων-εχθρών, η παρούσα διατριβή επικεντρώνεται στη διερεύνηση της ελληνικής βιοποικιλότητας για την ανάπτυξη νέων, οικονομικών και φιλικών προς το περιβάλλον και τον άνθρωπο φυσικών βιοκτόνων. Στο πλαίσιο αυτό μελετήθηκαν τα αιθέρια έλαια που προέρχονται από τρεις ευδιάκριτες ομάδες της ελληνικής φυτικής βιοποικιλότητας: την αυτοφυή, την αγροτική και τη διατροφική βιοποικιλότητα. Συγκεκριμένα, η διατριβή επικεντρώθηκε στη μελέτη των αιθερίων ελαίων από αυτοφυείς πληθυσμούς κέδρων (Γένος *Juniperus*, Οικογένεια Cupressaceae), καλλιεργούμενων ειδών εσπεριδοειδών (Γένος *Citrus*, Οικογένεια Rutaceae) και από ένα φάσμα αυτοφυών και καλλιεργούμενων αρωματικών-αρτυματικών φυτών (Οικογένειες: Lamiaceae, Apiaceae, Asteraceae, Rutaceae, Solanaceae). Τα αιθέρια έλαια μελετήθηκαν ως προς τη χημική τους σύσταση και την απωθητική και προνυμοφκτόνο δράση τους έναντι του χωροκατακτητικού είδους *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Ασιατικό κουνούπι Τίγρης). Παράγοντες όπως η μηχανική επεξεργασία του φυτικού υλικού, η εποχιακή ποικιλότητα και η μεθοδολογία παραλαβής, συμπεριλαμβανομένης της βιομηχανικής επεξεργασίας, μελετήθηκαν στο πλαίσιο βελτιστοποίησης της απόδοσης, της χημικής ποικιλότητας και της βιολογικής δράσης των ελαίων, με σκοπό την επιλογή-ανάπτυξη των καταλληλότερων φυσικών βιοκτόνων.

1.4.1. Αυτοφυής βιοποικιλότητα - Το γένος *Juniperus*

Οι κέδροι είναι κωνοφόρα αειθαλή δέντρα που ανήκουν στην Οικογένεια των Κυπαρισσίδων (Cupressaceae) και στο Γένος *Juniperus*. Αποτελούν κοινά είδη στο βόρειο ημισφαίριο, φτάνοντας τα 70 στον αριθμό και απαντώνται σε ένα ευρύ φάσμα φυσικών ενδιαιτημάτων (Milos and Radonic, 2000; Adams, 2000; Munoz-Reinozo 2004). Στον Ελλαδικό χώρο αυτοφύονται 7 είδη κέδρων: *Juniperus drupacea* (Άρκευθος η δρυπώδης), *Juniperus communis* L. (Άρκευθος η κοινή) *Juniperus oxycedrus* L. (Άρκευθος η οξύκεδρος), *Juniperus phoenicea* L. (Άρκευθος η φοινικική), *Juniperus excelsa* L. (Άρκευθος η υψηλή) *Juniperus sabina* L. (Άρκευθος η σαβίνα). Τα είδη αυτά χαρακτηρίζονται από το μεγάλο μέγεθος των κορμών τους, την ογκώδη, ακανόνιστη κόμη των κλαδιών τους και τα βελονοειδή και άκαμπτα φύλλα τους. Κάθε φύλλο διαθέτει δύο ρητινοφόρους αγωγούς και παραμένει στο δέντρο από 3 έως 6 χρόνια. Οι κώνοι του κέδρου είναι συνήθως σφαιρικοί και

διαφοροποιούνται ως προς το χρώμα και το μέγεθος ανάλογα με το φύλο, το στάδιο ωρίμανσής τους, αλλά και το είδος του φυτού.

Τα είδη της οικογένειας Cupressaceae είναι γνωστά για τις φαρμακευτικές τους ιδιότητες και τη χρήση τους στη λαϊκή ιατρική (folk medicine) (Adorjan and Buchbauer, 2010). Ειδικότερα, τα φυτά του γένους *Juniperus* θεωρείται ότι έχουν διουρητικές, αντισηπτικές και αντιρευματικές ιδιότητες, ενώ σκευάσματα αποξηραμένων καρπών ή αιθερίων ελαίων αυτών των φυτών αναφέρεται ότι ανακουφίζουν από τη δυσπεψία (Newall et al., 1996). Το ξύλο των κέδρων αξιοποιείται ιδιαίτερα στην κατασκευαστική ξυλεία, καθώς δεν προσβάλλεται εύκολα από παράσιτα και ασθένειες. Μια άλλη σημαντική χρήση της ρητίνης των κέδρων περιγράφεται από τον ιστορικό Ηρόδοτο, ο οποίος αναφέρεται στη συντήρηση των ανθρώπινων ιστών (μούμιες) στην αρχαία Αίγυπτο (AbdelMaksouda and El-Amin, 2011). Η χρήση αυτή αναφέρεται και από τον θεμελιωτή της φαρμακολογίας Διοσκουρίδη (40-90 μ.Χ.), ο οποίος αναφέρεται στα φυτά του γένους *Juniperus* με τον χαρακτηρισμό ως «η ζωή των νεκρών». Πολύ αργότερα, μετά από σειρά βιολογικών πειραμάτων, επιβεβαιώθηκε η ισχυρή αντιμυκητιακή και αντι-βακτηριακή δράση των φυτών αυτών (Karaman et al. 2003). Πέραν από τις ιδιότητες αυτές, τα φυτά του γένους *Juniperus* αποτελούν μια σημαντική πηγή αιθερίων ελαίων με ποικίλες βιολογικές δράσεις (Kanat and Alma, 2004; Gao et al., 2004; Adorjan and Buchbauer, 2010).

Οι μελέτες, που εξετάζουν τη δράση των αιθερίων ελαίων των κέδρων με στόχο την απώθηση και τον πληθυσμιακό έλεγχο των κουνουπιών είναι μάλλον περιορισμένες. Συγκεκριμένα, το είδος *J. macropoda* έχει δείξει σημαντική προνυμφοκτόνο και ωοκτόνο δράση έναντι των ειδών *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* και *Culex quinquefasciatus* (Prajapati et al., 2005). Τα είδη *J. virginiana* και *J. communis* έχουν εμφανίσει ισχυρή προνυμφοκτόνο, αλλά και απωθητική δράση έναντι των ειδών *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* και *Culex quinquefasciatus* (Amer and Mehlhorn, 2006a; Amer and Mehlhorn, 2006b; Carroll et al. 2011), ενώ το είδος *J. procera* που παραδοσιακά χρησιμοποιείται στην αφρικανική ήπειρο ως εντομο-απωθητικό, έχει εμφανίσει ισχυρή απωθητική δράση κατά του φορέα της ελονοσίας *Anopheles arabiensis* (Karunamoorthi et al., 2014).

Τα αιθέρια έλαια από αυτοφυή στην Ελλάδα είδη κέδρων έχουν αξιολογηθεί ως προς τη βιοδραστικότητά τους στα κουνούπια σε δύο μόνο μελέτες. Μια πρώτη που αξιολόγησε τη δράση των αιθερίων ελαίων από έξι αυτοφυή είδη κέδρου (*J. communis* ssp. *hemispaerica*, *J. drupacea*, *J. foetidissima*, *J. oxycedrus* ssp. *macrocarpa*, *J. oxycedrus* ssp. *oxycedrus* και *J. phoenicea*) έναντι των προνυμφών του είδους *Culex pipiens* έδειξε ότι το αιθέριο έλαιο από τον κορμό του *J. drupacea* εμφανίζει την ισχυρότερη δράση, ενώ ως μέτρια αξιολογήθηκε η

δράση των αιθερίων ελαίων που προέρχονται από τους καρπούς και τα φύλλα των *J. drupacea* και *J. foetidissima*, τα φύλλα των *J. oxycedrus* ssp. *macrocarpa*, *J. phoenicea* και *J. communis* ssp. *hemisphaerica* και τους καρπούς του *J. oxycedrus* ssp. *oxycedrus* (Vourlioti-Arapi et al., 2012). Η μελέτη των Giatropoulos et al. (2013) είναι η μοναδική που μελετάει την προνυμφοκτόνο, αλλά και απωθητική δράση ενός αυτοφυούς είδους κέδρου (*J. phoenicea*) έναντι του χωροκατακτητικού είδους *Ae. albopictus*.

Όσον αφορά τη χημική σύσταση των αιθερίων ελαίων των κέδρων, ενώ έχει αναλυθεί στο πλαίσιο αρκετών μελετών, λίγες είναι οι γνώσεις αναφορικά με την κατανομή των εναντιομερών των διαφόρων συστατικών, αλλά και σχετικά με τους μηχανισμούς της βιολογικής τους δράσης. Γενικά, τα αιθέρια έλαια των κέδρων αποτελούνται από ένα σύνολο φυτοχημικών, κυρίως μονοτερπένια και σεσκιτερπένια, όπως (-)- α -πινένιο, σαμπινένιο, μυρκένιο, δ -3-καρένιο, λεμονένιο και β -φυλλανδρένιο σε διαφορετικές αναλογίες, που εξαρτάται από το είδος, το μέρος του φυτού και το στάδιο ανάπτυξής του. Οι Vourlioti-Arapi et al. (2012) παρατήρησαν ότι η περιεκτικότητα των ελαίων που μελέτησαν σε (-)- α -πινένιο σχετίζεται αρνητικά με την προνυμφοκτόνο δράση τους. Μελέτες της βιολογικής δράσης μεμονωμένων συστατικών που περιέχονται στα αιθέρια έλαια των κέδρων έχουν δείξει ότι το ακυκλικό μονοτερπένιο μυρκένιο παρουσιάζει την ισχυρότερη δράση (Vourlioti-Arapi et al., 2012), ενώ από τα τέσσερα ισομερή του πινενίου, το (-)- β εναντιομερές είναι πολύ πιο τοξικό (Michaelakis et al., 2009; Vourlioti-Arapi et al., 2012). Η σημαντικά ισχυρότερη δράση, ωστόσο, του αιθερίου ελαίου από τον κορμό του *J. drupacea* σε σχέση με αυτό από τους καρπούς του *J. oxycedrus*-*oxycedrus*, παρ' ότι εμφανίζουν παρόμοιο φυτοχημικό προφίλ, με το δεύτερο να περιέχει μεγαλύτερο ποσοστό μυρκένιου, αποδόθηκε στην παρουσία στο πρώτο ορισμένων δευτερευόντων συστατικών σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (Vourlioti-Arapi et al., 2012). Τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν τη σημασία της συνεργιστικής δράσης των συστατικών των αιθερίων ελαίων στην ενισχυμένη βιολογική δράση έναντι των κουνουπιών.

Οι έως τώρα μελέτες έχουν δείξει ότι τα φυτά του γένους *Juniperus* μπορούν δυνητικά να αποτελέσουν σημαντικές πηγές αιθερίων ελαίων για την ανάπτυξη πράσινων βιοκτόνων με σκοπό τόσο την απόθεση, αλλά και τον πληθυσμιακό έλεγχο των κουνουπιών. Οι γνώσεις, σχετικά με τη βιοδραστικότητα των αιθερίων ελαίων της ελληνικής αυτοφυούς βιοποικιλότητας των κέδρων στα κουνούπια, και συγκεκριμένα έναντι του χωροκατακτητικού είδους *Aedes albopictus* είναι περιορισμένες. Επιπλέον, σύμφωνα με τις τελευταίες μελέτες, η διερεύνηση παραγόντων όπως η εποχιακή ποικιλότητα και η μέθοδος συλλογής και επεξεργασίας του φυτικού υλικού για την ανεύρεση των πιο κατάλληλων αιθερίων ελαίων ως προς την απόδοση, τη χημική σύσταση και τη βιοδραστικότητά τους κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική και χρήζει περαιτέρω μελέτης.

1.4.2. Αγροτική βιοποικιλότητα - Το γένος *Citrus*

Τα εσπεριδοειδή είναι φυτά του γένους *Citrus* (Οικογένεια Rutaceae), οι καρποί των οποίων καταναλώνονται ευρύτατα παγκοσμίως και κατά κόρον αξιοποιούνται στη βιομηχανία παραγωγής χυμών και αφεψημάτων. Κατά τη βιομηχανική επεξεργασία των καρπών των εσπεριδοειδών παράγονται σημαντικές ποσότητες παραπροϊόντων τα οποία αποτελούν δυνητική πηγή πολύτιμων συστατικών, όπως διαλυτά σάκχαρα, κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, πηκτίνη και αιθέρια έλαια (Rezzadori et al., 2012). Τα αιθέρια έλαια μπορούν να απομονωθούν εύκολα σε μεγάλες ποσότητες με απόσταξη ή την άσκηση υψηλής πίεσης στους φλοιούς των καρπών (Hardin et al., 2010) και χρησιμοποιούνται ως πρώτες ύλες για ποικίλες βιομηχανικές διεργασίες. Όμως, παρά τις χρήσεις τους ως αρωματικές ύλες σε ποτά, τρόφιμα, αρώματα, καλλυντικά και φάρμακα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η βιολογική τους δράση σε μικροοργανισμούς και έντομα, συμπεριλαμβανομένων των κουνουπιών.

Τα αιθέρια έλαια ή εκχυλίσματα διαφόρων τμημάτων φυτών του γένους *Citrus*, καθώς επίσης και τα συστατικά τους, έχουν μελετηθεί εκτενώς για την τοξική τους δράση εναντίον προνυμφών διαφόρων ειδών κουνουπιών υγειονομικής σημασίας. Συγκεκριμένα, η προνυμφοκτόνος δράση τους κατά των ειδών *Culex quinquefasciatus*, *Culex pipiens*, *Aedes aegypti* και *Anopheles stephensi* έχει μελετηθεί εκτενώς, με ελπιδοφόρα αποτελέσματα (Sujatha et al., 1988; Kassir et al., 1989; Mwaiko and Savaeli, 1994; Dakhil and Morsy, 1999; Amer and Mehlhorn, 2006b; Lee, 2006; Melliou et al., 2009; Michaelakis et al., 2009; Murugan et al., 2012; Warikoo et al., 2012; Galvão et al., 2015). Κατά των προνυμφών του χωροκατακτητικού είδους *Aedes albopictus*, έχουν παρουσιάσει ισχυρή δράση τα αιθέρια έλαια των *C. sinensis*, *C. limon* και *C. paradisi* (Morales-Saldaña et al. 2007, Akram et al. 2010, Din et al. 2011, Hafeez et al., 2011; Giatropoulos et al., 2012; Campolo et al., 2015).

Παρά τη μεγάλη ζήτηση απωθητικών ουσιών φυσικής προέλευσης για προστασία από τα κουνούπια, οι γνώσεις περί της απωθητικής δράσης των αιθερίων ελαίων των φυτών του γένους *Citrus* είναι περιορισμένες. Συγκεκριμένα, έχουν μελετηθεί τα αιθέρια έλαια του *C. sinensis* ως προς την απωθητική τους δράση κατά των ειδών *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi* και *Anopheles dirus* (Siriporn and Mayura, 2010; Phasomkusolsil and Soonwera, 2011). Αντίστοιχα, εναντίον των τελείων *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* και *Aedes albopictus* έχει αξιολογηθεί η δράση των αιθερίων ελαίων του *C. limon* (Oshaghi et al. 2003; Kazembe and Chaibva, 2012; Giatropoulos et al. 2012). Ο Soonwera (2015) μελέτησε την απωθητική δράση του *C. aurantifolia* για τα είδη *Aedes aegypti* και *Culex*

quinquefasciatus, ενώ έναντι των τελείων του *Anopheles dirus* έχει μελετηθεί και η δράση του *C. hystrix* (Tawatsin et al., 2001).

Οι καρποί των ειδών *Citrus* αποτελούνται από ένα σύνολο φυτοχημικών συστατικών, κυρίως μονοτερπενίων, διτερπενίων και τριτερπενίων τα οποία έχουν μελετηθεί διεξοδικά και θεωρείται ότι εμπλέκονται σε ποικίλες βιολογικές δράσεις. Τα αιθέρια έλαια των εσπεριδοειδών αποτελούνται κυρίως από πτητικά μονοτερπένια, με κυρίαρχο το λεμονένιο, σε ποσοστά έως και 95%, αλλά και δευτερεύοντα συστατικά όπως το μυρκένιο, α - και β -πινένιο, γ -τερπινένιο, 4-τερπινεόλη, γερανιάλη, νεράλη κλπ. Η προνυμφοκτόνος δράση των ελαίων αυτών έχει κυρίως αποδοθεί στην περιεκτικότητά τους σε λεμονένιο (Kassir et al., 1989; Chantraine et al., 1998; Michaelakis et al., 2008; Pohlit et al., 2011; Giatropoulos et al., 2012) και γ -τερπινένιο (Cheng et al., 2009; Perumalsamy et al., 2009; Pohlit et al., 2011; Giatropoulos et al., 2012). Μελέτη που συνέκρινε την προνυμφοκτόνο δράση των εναντιομερών μορφών διαφορετικών συστατικών, τα εναντιομερή του λεμονενίου και του γ -τερπινενίου εμφάνισαν την ισχυρότερη δράση, ενώ από τα πινένια, τα εναντιομερή του β -πινένιου εμφάνισαν μεγαλύτερη τοξικότητα σε σύγκριση με τα α -πινένια (Giatropoulos et al., 2012). Όσον αφορά την απωθητική δράση τους, αυτή έχει συνδεθεί με την περιεκτικότητά τους περισσότερο σε αλδεΰδες (π.χ. κιτράλη), οξείδια (π.χ. οξείδιο του λεμονενίου) και αλκοόλες (π.χ. 4-τερπινεόλη) και όχι σε υδρογονάνθρακες (π.χ. λεμονένιο, α - ή β -πινένιο) (Hao et al., 2008; Weldon et al., 2011; Giatropoulos et al., 2012).

Στο πλαίσιο της αποτελεσματικής, και συγχρόνως φιλικής προς το περιβάλλον και τον άνθρωπο, διαχείρισης των κουνουπιών-φορέων και της κυκλικής οικονομίας η διερεύνηση της βιοδραστικότητας των αιθερίων ελαίων που παράγονται ως παραπροϊόντα της βιομηχανικής επεξεργασίας των καρπών των ειδών *Citrus* είναι μια ενδιαφέρουσα προοπτική. Οι μελέτες που εξετάζουν τη δράση των αιθερίων ελαίων του γένους *Citrus* κατά του είδους *Aedes albopictus* είναι περιορισμένες, ενώ μεγάλο κενό υπάρχει στη βιβλιογραφία όσον αφορά τη βιοδραστικότητα των αιθερίων ελαίων που προκύπτουν ως παραπροϊόντα της βιομηχανικής επεξεργασίας των καρπών *Citrus*. Επιπλέον, σύμφωνα με τις έως τώρα μελέτες, η κατανόηση των μηχανισμών δράσης τους στα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης των κουνουπιών και η μελέτη της απαιτούμενης δοσολογίας χρήζει περαιτέρω έρευνας.

1.4.3. Ελληνικά αρωματικά - αρτυματικά φυτά

Τα αρωματικά και θεραπευτικά φυτά κατείχαν ανέκαθεν εξέχουσα θέση στους πολιτισμούς όλων των λαών σε όλο το διάβα της ιστορίας. Τα ίδια τα αρωματικά φυτά έγιναν αρτύματα και μπαχαρικά, μεταφέροντας τις αντιβιοτικές τους δράσεις στα τρόφιμα, διευκολύνοντας τη συντήρησή τους και βελτιώνοντας τις οργανοληπτικές τους ιδιότητες. Η χρήση τους δεν περιορίστηκε στη διατροφή, αλλά αποτέλεσαν πρώτη ύλη για την παραλαβή αιθερίων ελαίων που χρησιμοποιούνταν για θεραπευτικούς ή άλλους λιγότερο ευγενείς σκοπούς, όπως η ανθρώπινη ματαιοδοξία. Η πρώτη γραπτή μαρτυρία για τη χρήση των αρωματικών φυτών στην Ελλάδα τεκμηριώνεται από τον 17ο π.Χ. αιώνα, αφού μια από τις πρώτες λέξεις που αναγνώσθηκαν στην μυκηναϊκή γραφή Γραμμική Β, αναφέρονταν στον Κόλιανδρο (*Coriandrum sativum* L.) και το Κύμινο (*Cuminum cyminum* L.) ως μπαχαρικά (Constance, 1971). Ανάμεσα στις Οικογένειες που παράγουν αρωματικά φυτά, ξεχωρίζουν για την ιδιαίτερα πλούσια βιοποικιλότητά τους στον ελλαδικό χώρο οι Οικογένειες των Χειλανθών (Lamiaceae), των Σκιαδανθών (Ariaceae) και των Σύνθετων (Asteraceae).

Η οικογένεια των Χειλανθών είναι μία από τις μεγαλύτερες και πιο χαρακτηριστικές οικογένειες αρωματικών-αρτυματικών φυτών με περίπου 220 γένη και σχεδόν 4.000 είδη παγκοσμίως. Τα φυτά της οικογένειας αυτής έχουν σχεδόν κοσμοπολιτική διασπορά, ενώ ορισμένα γένη της εμφανίζουν μεγάλη βιοποικιλότητα στη λεκάνη της Μεσογείου. Τα φυτά της οικογένειας Lamiaceae είναι γνωστά για τα αιθέρια έλαιά τους, τα οποία είναι κοινά σε πολλά φυτικά είδη της προσδίδοντάς τους χαρακτηριστική οσμή και γεύση (Naghibi et al., 2005). Παραδοσιακά, έχουν χρησιμοποιηθεί για τις φαρμακευτικές τους ιδιότητες κυρίως για ασθένειες του πεπτικού συστήματος, όπως η δυσπεψία, καθώς και για δερματικές παθήσεις ή ως αναλγητικά και αντιφλεγμονώδη (Naghibi et al., 2005). Τα τελευταία χρόνια, η βιολογική τους δράση κατά των εντόμων έχει προσελκύσει σε σημαντικό επιστημονικό ενδιαφέρον. Σύμφωνα με βιβλιογραφική ανασκόπηση του Boulogne et al. (2012) που περιλαμβάνει 1965 αναφορές, οι οποίες χρονολογούνται από το 1923 έως το 2010, η οικογένεια Lamiaceae είναι εκείνη με τις περισσότερες αναφορές μεταξύ των οικογενειών με σημαντικές εντομοκτόνες ιδιότητες, καταλαμβάνοντας το 28% του συνόλου των βιβλιογραφικών αναφορών. Περιλαμβάνει 181 είδη (48 γένη), με τις περισσότερες βιβλιογραφικές αναφορές για εντομοκτόνο δράση να αφορούν στα παρακάτω 9 γένη: *Pycnanthemum*, *Teucrium*, *Thymus*, *Satureja*, *Micromeria*, *Origanum*, *Mentha*, *Monarda* και *Ocimum*.

Ένα ευρύ φάσμα αιθερίων ελαίων, προερχόμενα κυρίως από φυτά των γενών *Thymus*, *Ocimum*, *Origanum*, *Mentha*, *Salvia*, *Melissa*, *Satureja*, *Rosmarinus* και *Lavandula* έχουν μελετηθεί για την προνυμφοκτόνο ή/και απωθητική τους δράση έναντι διαφόρων ειδών

κουνουπιών (Sukumar et al., 1991; Tawatsin et al., 2001; Choi et al., 2002; Trabousli et al., 2002; Oshaghi et al., 2003; Cavalcanti et al., 2004; Amer and Mehlhorn, 2006a; Cetin and Yanikoglu, 2006; Tawatsin et al., 2006; Zhu et al., 2006; Anees, 2008; Gbolade and Lockwood, 2008; Drapeau et al., 2009; Pavela, 2009; Pavela et al., 2009; Andreadis et al., 2009; Koliopoulos et al., 2010; Nerio et al., 2010; Phasomkusolsil and Soonwera, 2010; Kalaivani et al., 2011; Kumar et al., 2011; Maia and Moore, 2011; Michaelakis et al., 2011; Pitarokili et al., 2011; Rajamma et al., 2011; Sritabutra et al., 2011; Govindarajan et al., 2012; Koc et al., 2012; El-Akhal et al., 2014; Murugan et al., 2015; Govindarajan et al., 2016; Bouguerra et al., 2017). Εντούτοις, οι μελέτες που εξετάζουν τη βιολογική δράση αιθερίων ελαίων φυτών της οικογένειας Lamiaceae εναντίον του *Aedes albopictus*, ενός κουνουπιού με μεγάλη οικολογική και υγειονομική σημασία, είναι μάλλον περιορισμένες. Συγκεκριμένα, με σκοπό την αντιμετώπιση αυτού του είδους, έχει αξιολογηθεί η προνυμφοκτόνος δράση αιθερίων ελαίων των φυτών *Lavandula angustifolia*, *Rosmarinus officinalis* (Conti et al. 2010; Giatropoulos et al., 2018), *Hyptis suaveolens* (Conti et al. 2012a), *Salvia* spp. (Mathew and Thoppil 2011), *Ocimum gratissimum* (Sumitha and Thoppil, 2015) *Mentha* spp., *Origanum* spp., *Mellisa officinalis*, *Satureja thymbra*, *Ocimum basilicum* και *Thymus vulgaris* (Giatropoulos et al., 2018), καθώς και η απωθητική δράση αιθερίων ελαίων των ειδών *Thymus vulgaris* (Zhu et al. 2006; Giatropoulos et al., 2018), *Salvia* spp. (Conti et al. 2012b), *Hyptis suaveolens* (Conti et al. 2012a), *Ocimum sanctum* (Tawatsin et al. 2006), *Mentha* spp. (Yang and Ma 2005; Giatropoulos et al., 2018), *Lavandula angustifolia*, *Rosmarinus officinalis*, *Origanum* spp., *Mellisa officinalis*, *Satureja thymbra* και *Ocimum basilicum* (Giatropoulos et al., 2018). Από τις μελέτες αυτές, οι πέντε εστιάζουν στη δράση των αιθερίων ελαίων που προέρχονται από την ελληνική βιοποικιλότητα των Χειλανθών (Andreadis et al., 2009; Koliopoulos et al., 2010; Michaelakis et al., 2011; Pitarokili et al., 2011; Giatropoulos et al., 2018), εκ των οποίων μόνο η μία μελετάει τη δραστηριότητα ορισμένων ειδών της Οικογένειας κατά του είδους *Aedes albopictus* (Giatropoulos et al., 2018).

Τα **Σκιαδανθή** αποτελούν μία Οικογένεια φυτών με ιδιαίτερο γεωργικό χαρακτήρα, αφού συμπεριλαμβάνει πολλές καλλιέργειες κηπευτικών και αρτυματικών ειδών αλλά και μπαχαρικών, όπως το Μάραθο, ο Μαϊντανός, ο Άνηθος, ο Κόλιανδρος, το Καρότο, τα Μυρώνια, οι Καυκαλήθρες, το Κύμινο, το Κάρυ και πολλές άλλες τοπικές καλλιέργειες. Χαρακτηρίζεται, δε, από την παρουσία αιθερίων ελαίων σχεδόν στο σύνολο των γενών της (Tutin et al., 1968), σε βαθμό που να θεωρείται καθολικό χαρακτηριστικό της Οικογένειας (Hegnauer, 1971). Σε αυτά τα πλαίσια, η ελληνική βιοποικιλότητα των Σκιαδανθών μπορεί να θεωρηθεί ως ένας πολύτιμος ανανεώσιμος φυσικός πόρος με σκοπό τη διερεύνηση νέων χρήσεων των αιθερίων ελαίων τους, αλλά και τον εντοπισμό νέων καλλιεργειών.

Οι έως τώρα μελέτες έχουν αναδείξει πολλά αιθέρια έλαια της Οικογένειας των Σκιαδανθών ως υποσχόμενους παράγοντες παρασιτικού ελέγχου (Kim et al. 2003; Lee 2004; Miyazawa et al. 2004; Regnault-Roger and Hamraoui 1994; Tsukamoto et al. 2005; Tunc et al. 2000). Η βιοδραστικότητα των εμπορικά διαθέσιμων αιθερίων ελαίων και όσων προέρχονται από τη φυσική βιοποικιλότητα της Οικογένειας αυτής έχει μελετηθεί έναντι προνυμφών διαφορετικών ειδών κουνουπιών υγειονομικής σημασίας (Eckenbach et al. 1999; Kim et al., 2002; Choochote, 2004; Orozco and Lentz, 2005; Prajapati et al., 2005; Tuetun et al., 2005; Trabousli et al., 2005; Lee, 2006; Promsiri et al., 2006; Amer and Mehlhorn, 2006b; Pitasawat et al., 2007; Pavela, 2008; Khater and Shalaby, 2008; Knio et al., 2008; Evergetis et al., 2009; Pandey et al., 2009; Pavela, 2009; Manolakou et al., 2009; Conti et al., 2010; Govindarajan et al., 2011; Evergetis et al., 2012; Benelli et al., 2013; Evergetis et al., 2013; Sumitha et al., 2014; Seo et al., 2015; Pavela et al., 2016; Govindarajan and Benelli, 2017; Benelli et al., 2017; Pavela et al., 2017a; Pavela et al., 2017b; Al-Mekhlafi, 2018; Pavela et al., 2020). Ωστόσο, λίγες είναι οι μελέτες που εστιάζουν στην απωθητική τους δράση. Ειδικότερα, έχει μελετηθεί η απωθητική δράση των αιθερίων ελαίων των ειδών *Pimpinella anisum* (Prajapati et al., 2005), *Foeniculum vulgare* (Kim et al., 2002; Trabousli et al., 2005) *Apium graveolens* (Choochote, 2004; Tuetun et al., 2005; Tuetun et al., 2009) και *Coriandrum sativum* (Benelli et al., 2013). Από τις παραπάνω μελέτες, μόνο τέσσερις μελετούν τη βιοδραστικότητά τους έναντι του είδους *Aedes albopictus* (Conti et al., 2010; Benelli et al., 2013; Sumitha et al., 2014; Seo et al., 2015; Govindarajan and Benelli, 2017).

Από την ελληνική βιοποικιλότητα των Σκιαδανθών έχουν αξιολογηθεί για την προνυμφοκτόνο δράση τους έναντι του είδους *Culex pipiens* αιθέρια έλαια από ένα ευρύ φάσμα αυτοφυών, αλλά και καλλιεργούμενων ειδών: (Evergetis et al., 2009; 2012; 2013). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μελετών αυτών, ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τις προνυμφοκτόνες ιδιότητές τους παρουσιάζουν τα αιθέρια έλαια του καλλιεργούμενου είδους *Anethum graveolens* (με τιμή LC_{50} στα $52,74 \text{ mg L}^{-1}$) (Evergetis et al., 2013), του ενδημικού είδους *Athamanta densa* (με τιμή LC_{50} στα $10,15 \text{ mg L}^{-1}$) (Evergetis et al., 2012) και του αυτοφυούς *Oenanthe pimpinelloides* (με τιμή LC_{50} στα $40,26 \text{ mg L}^{-1}$) (Evergetis et al., 2009). Η προνυμφοκτόνος δράση των ελαίων αυτών αποδόθηκε στην περίπτωση του *Anethum graveolens* στην υψηλή περιεκτικότητά τους σε α -φυλλανδρένιο (Evergetis et al., 2013), στην περίπτωση του *Athamanta densa* σχετίστηκε με την ύπαρξη ορισμένων σπάνιων στην Οικογένεια ενώσεων, όπως το μπισαμπολένιο (Evergetis et al., 2012) και στην περίπτωση του *Oenanthe pimpinelloides* συνδέθηκε με την περιεκτικότητά τους σε μη οξυγονωμένα μονοτερπένια (Evergetis et al., 2009). Όμως, υπάρχει μεγάλο κενό σχετικά με τις διαθέσιμες

γνώσεις για την αποθητική δράση των αιθερίων ελαίων των ελληνικών Σκιαδανθών, αλλά και την τοξικότητά τους κατά του χωροκατακτητικού είδους *Aedes albopictus*.

Τα **Σύνθετα** αποτελούν μία από τις πολυπληθέστερες Οικογένειες φυτών, αποτελούμενη από 1500 περίπου Γένη και πάνω από 22000 είδη, τα οποία εμφανίζουν σημαντική μορφολογική ποικιλότητα και παγκόσμια διασπορά. Η συμβολή της στην καταπολέμηση εντόμων-εχθρών είναι ήδη γνωστή από την ανακάλυψη των πυρεθρινών στα είδη *Chrysanthemum cinerariaefolium*, τα οποία αποτέλεσαν τη βάση για τη συνθετική παραγωγή μίας νέας κατηγορίας εντομοκτόνων, των πυρεθρινοειδών. Επιπλέον, σύγχρονα δεδομένα για τη βιοκτόνο δράση μεταβολιτών που προέρχονται από φυτά της οικογένειας Asteraceae έχουν στρέψει σημαντική μερίδα των επιστημόνων προς την κατεύθυνση αυτή (Govindarajan and Benelli 2016; Tavares et al. 2009; González-Coloma et al. 2005; Boussaada et al. 2008).

Αρκετές μελέτες έχουν εξετάσει την προνυμοκτόνο δράση των αιθερίων ελαίων των φυτών της Οικογένειας των Σύνθετων, έναντι διαφορετικών κουνουπιών υγειονομικής σημασίας (Govindarajan and Karuppanan, 2011; Ravindran et al., 2012; Cheah et al., 2013; Rajeswary and Govindarajan, 2013; Ali et al., 2014; Chellappand ian et al., 2017; Benelli et al., 2018; Govindarajan et al., 2018). Μικρότερος είναι ο αριθμός των μελετών που εστιάζουν στην αποθητική τους δράση (Samuel et al., 2012; Tennyson et al., 2012; Yang and Ma, 2005; Cheah et al., 2013; Singh and Mittal, 2014; Azeem et al., 2019) και ειδικότερα στην τοξικότητά τους κατά του είδους *Aedes albopictus* (Conti et al., 2010; Yadav et al., 2014; Yadav et al., 2015; Yang and Ma, 2005; Bedini et al., 2018; Govindarajan et al., 2018). Αξίζει να σημειωθεί πως δεν έχει έως τώρα μελετηθεί η βιοδραστικότητα στα κουνούπια αιθερίων ελαίων προερχόμενων απ' ευθείας από την ελληνική αυτοφυή βιοποικιλότητα της Οικογένειας Asteraceae.

Συμπερασματικά, η ελληνική βιοποικιλότητα των αρωματικών-αρτυματικών φυτών, αποτελεί έναν πολύτιμο φυσικό πόρο για την παραλαβή αιθερίων ελαίων με ποικίλες βιολογικές δράσεις, η αξιοποίηση των οποίων βρίσκεται ακόμα σε πρώιμο στάδιο. Τα αποτελέσματα των έως τώρα μελετών αναδεικνύουν τις προοπτικές τους ως υποσχόμενα φυσικά βιοκτόνα. Όμως, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την κατανόηση της χημικής τους πολυπλοκότητας, των μηχανισμών δράσης τους στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια των κουνουπιών, αλλά και την ανεύρεση των πιο κατάλληλων συνδυασμών των φυτοχημικών που εμπεριέχουν.

Κεφάλαιο 2.

Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Φυτικό Υλικό

2.1.1. Το γένος *Juniperus*

Από τη φυσική ελληνική βιοποικιλότητα, για τους σκοπούς της παρούσας διατριβής, επιλέχθηκαν προς μελέτη τα αυτοφυή είδη κέδρων: *Juniperus phoenicea* L. (Εικόνα 2.1), *J. drupacea* Labill (Εικόνα 2.2). Για τα περισσότερα είδη, η συλλογή του φυτικού υλικού πραγματοποιήθηκε σε τρία διαφορετικά αναπαραγωγικά στάδια των φυτών:

- 1) την περίοδο του ληθάργου (Χειμώνας),
- 2) την περίοδο της βλάστησης–ανθοφορίας (Ανοιξη), και
- 3) κατά την πρόωμη ωρίμανση των καρπών (Καλοκαίρι).

Συγκεκριμένα, από κάθε αναπτυξιακό στάδιο συλλέχθηκαν τα παρακάτω δείγματα: α) φύλλα, β) ώριμοι καρποί και γ) ανώριμοι καρποί (ανάλογα με τη διαθεσιμότητα). Πλήρη στοιχεία της συλλογής περιλαμβάνονται στον Πίνακα 2.1.1. Αποξηραμένα δείγματα από το κάθε είδος βρίσκονται στη Βοτανική Συλλογή (Ερμάριο) του Εργαστηρίου Συστηματικής Βοτανικής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.



Εικόνα 2.1. Δέντρο (αριστερά) και καρποί (δεξιά) του είδους *J. phoenicea* L.



Εικόνα 2.2. Δέντρο (αριστερά) και καρποί (δεξιά) του είδους *J. drupacea* Labill

Πίνακας 2.1.1. Κωδικοί και δεδομένα συλλογής και επεξεργασίας των ειδών *Juniperus*.

| Κωδικός | Είδος φυτού | Τόπος Συλλογής | Εποχή Συλλογής (Ημερομηνία Συλλογής) | Μέρος του Φυτού | |
|---------|-----------------------------|--|---|--------------------------|-------|
| J 01 | <i>Juniperus phoenicea</i> | <i>Stereia Hellas,</i> <i>Antikira,</i> <i>Cape Kefalos,</i> <i>Alt. 10 m</i> <i>Long: 22° 63' E</i> <i>Lat: 38° 35' N)</i> | Χειμώνας (14 Δεκ. 2013) | Φύλλα | |
| J 02* | | | | Ανώριμοι καρποί | |
| J 03 | | | | Ωριμοι καρποί | |
| J 04* | | | | Φλοιός | |
| J 05 | | | | Φύλλα | |
| J 06* | | | | Ανώριμοι καρποί | |
| J 07 | | | | Φλοιός | |
| J 08* | | | | Φύλλα | |
| J 09 | | | | Ανοιξη (17 Απρ. 2014) | Φύλλα |
| J 10* | | | | Ανώριμοι καρποί | |
| J 11* | Φλοιός | | | | |
| J 12 | <i>Juniperus drupacea</i> | <i>Peloponnesus,</i> <i>Mt. Parnon,</i> <i>Alt. 950 m</i> <i>Long: 22° 34' E</i> <i>Lat: 37° 32' N</i> | Καλοκαίρι (15 Αυγ. 2014) | Φύλλα | |
| J 13* | | | | Ανώριμοι καρποί | |
| J 14 | | | | Ωριμοι καρποί | |
| J 15* | | | | Φλοιός | |
| J 16 | | | | Φύλλα | |
| J 17* | | | | Ανώριμοι καρποί | |
| J 18 | | | | Ανοιξη (19 Απρ. 2014) | Φύλλα |
| J 19* | | | | Ανώριμοι καρποί | |
| J 20 | | | | Ωριμοι καρποί | |
| J 21* | | | | Φλοιός | |
| J 22 | Φύλλα | | | | |
| J 23* | Καλοκαίρι (16 Αυγ. 2014) | | | Ανώριμοι καρποί | |
| J 24 | | | | Φύλλα | |
| J 25 | | | | Ανώριμοι καρποί | |
| J 26* | | | | Φύλλα | |
| J 27 | | | | Ανώριμοι καρποί | |
| J 28* | | | | Φύλλα | |
| J 29 | | | | Ανώριμοι καρποί | |
| J 30* | | | | Φύλλα | |
| J 31 | | | | Ανώριμοι καρποί | |
| J 32* | | | | | |
| J 33** | | | | | |

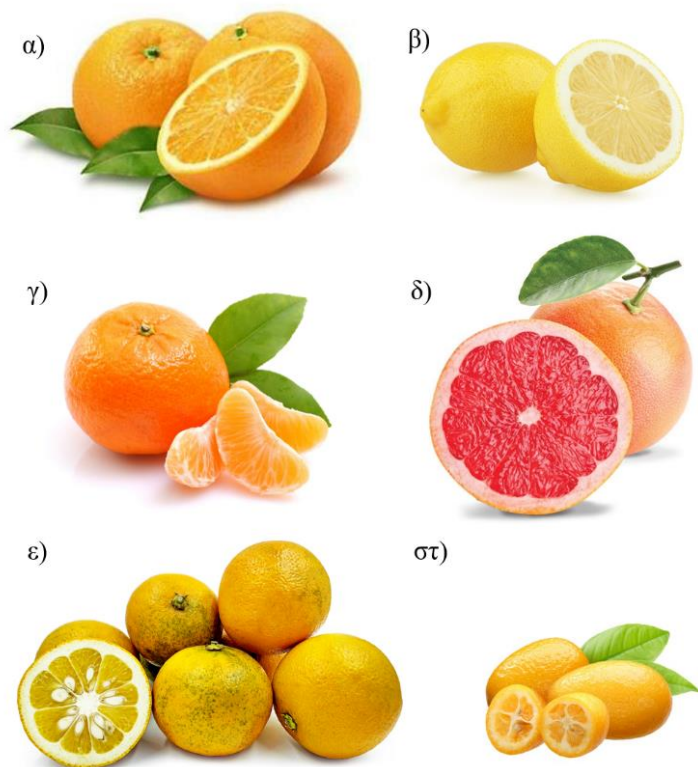
* Επεξεργασμένο φυτικό υλικό

** Επεξεργασμένο φυτικό υλικό / υποβλήθηκε σε όξινη απόσταξη

2.1.2. Το γένος *Citrus*

Από την αγροτική βιοποικιλότητα, αξιοποιήθηκαν στο πλαίσιο διενέργειας της παρούσας διατριβής τα αιθέρια έλαια που προκύπτουν ως παραπροϊόντα της βιομηχανικής επεξεργασίας για την παραγωγή χυμών των φρούτων *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Πορτοκαλιά), *C. limon* (L.) Osbeck (Λεμονιά), *C. paradisi* Macfad. (Γκρέιπφρουτ), *C. reticulata* Blanco (Μανταρινιά). Τα παραπάνω βιομηχανικής προέλευσης αιθέρια έλαια αποτέλεσαν ευγενική προσφορά της βιομηχανίας χυμών ΑΦΟΙ ΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΥ ΑΕ.

Επιπλέον, με σκοπό την παραλαβή των αιθερίων τους ελαίων, συλλέχθηκαν οι καρποί από έξι διαφορετικά είδη εσπεριδοειδών που καλλιεργούνται στην Ελλάδα. Συγκεκριμένα, συλλέχθηκαν ώριμοι καρποί των ειδών που αποτέλεσαν την πρώτη ύλη των αντίστοιχων βιομηχανικών παραπροϊόντων: *Citrus sinensis*, *C. limon*, *C. paradisi*, *C. reticulata* (**Εικόνα 2.3**). Επιπλέον συλλέχθηκαν καρποί των ειδών *C. x aurantium* L. (Νεραντζιά) και *C. japonica* Thunb. (Κουμκουάτ) (**Εικόνα 2.3**). Με εξαίρεση το κουμκουάτ που προήλθε από την Κέρκυρα, τα υπόλοιπα φρούτα συγκομίστηκαν στο Κιάτο Κορινθίας. Τα πλήρη στοιχεία της προέλευσης των αιθερίων ελαίων περιλαμβάνονται στον **Πίνακα 2.1.2**.



Εικόνα 2.3. Καρποί των ειδών α) *Citrus sinensis*, β) *Citrus limon*, γ) *Citrus reticulata*, δ) *Citrus paradisi*, ε) *Citrus x aurantium* και στ) *Citrus japonica*.

Πίνακας 2.1.2. Κωδικοί και δεδομένα προέλευσης των αιθερίων ελαίων των ειδών *Citrus*.

| Κωδικός | Είδος | Προέλευση | Μέθοδος Παραλαβής ΑΕ |
|---------|--------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| C 01 | <i>Citrus x paradisi</i> | Βιομηχανικής προέλευσης ΑΕ | Κρυο-συμπίεση |
| C 02 | | | 1° Κλάσμα υδροαπόσταξης C01* |
| C 03 | | | 2° Κλάσμα υδροαπόσταξης C01** |
| C 04 | | Κιάτο, Πελοπόννησος | Υδροαπόσταξη καρπών |
| C 05 | <i>Citrus limon</i> | Βιομηχανικής προέλευσης ΑΕ | Κρυο-συμπίεση |
| C 06 | | | 1° Κλάσμα υδροαπόσταξης C05* |
| C 07 | | | 2° Κλάσμα υδροαπόσταξης C05** |
| C 08 | | | Υδροαπόσταξη καρπών |
| C 09 | <i>Citrus reticulata</i> | Βιομηχανικής προέλευσης ΑΕ | Κρυο-συμπίεση |
| C 10 | | | 1° Κλάσμα υδροαπόσταξης C09* |
| C 11 | | | 2° Κλάσμα υδροαπόσταξης C09** |
| C 12 | | Κιάτο, Πελοπόννησος | Υδροαπόσταξη καρπών |
| C 13 | <i>Citrus sinensis</i> | Βιομηχανικής προέλευσης ΑΕ | Κρυο-συμπίεση |
| C 14 | | | 1° Κλάσμα υδροαπόσταξης C13* |
| C 15 | | | 2° Κλάσμα υδροαπόσταξης C13** |
| C 16 | | | Υδροαπόσταξη καρπών |
| C 17 | <i>Citrus japonica</i> | Κέρκυρα | Υδροαπόσταξη καρπών |
| C 18 | <i>Citrus aurantium</i> | Κιάτο, Πελοπόννησος | Υδροαπόσταξη καρπών |

* πρώτα 10' της υδροαπόσταξης

** υπόλοιπες 2 ώρες και 50' της υδροαπόσταξης

2.1.3. Ελληνικά αρωματικά- αρτυματικά φυτά

Από την πληθώρα των ελληνικών αρωματικών-αρτυματικών φυτών, για τους σκοπούς της διατριβής, συλλέχθηκαν αυτοφυή είδη των Οικογενειών Rutaceae, Solanaceae, Apiaceae, Lamiales και Asteraceae. Στον **Πίνακα 2.1.3** παρουσιάζεται αναλυτικά το σύνολο των ειδών μαζί με τα στοιχεία συλλογής (τόπος και εποχή). Η ταυτοποίηση των περισσότερων ειδών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ταξινομικών κλειδών της Flora Europaea (Tutin et al., 1968), ενώ για την ταυτοποίηση του *Echinophora tenuifolia* ssp. *sibthorpiana* (Guss.) Tutin χρησιμοποιήθηκε η Flora Aegaea (Rechinger, 1943). Για την τεκμηρίωση της συλλογής, συλλέχθηκαν και αποξηράνθηκαν δείγματα φυτών, τα οποία κατατέθηκαν στην Βοτανική Συλλογή (Ερμπάριο) του Εργαστηρίου Συστηματικής Βοτανικής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Πίνακας 2.1.3. Κωδικοί και δεδομένα συλλογής των αρωματικών-αρτυματικών ειδών.

| Κωδικός | Είδος | Οικογένεια | Τόπος Συλλογής | Έτος Συλλογής | Εποχή Συλλογής | Μέρος φυτού |
|---------|--|------------|-------------------|---------------|----------------|----------------|
| V 01 | <i>Ruta chalepensis</i> L. | Rutaceae | Πάρος | 2013 | Άνοιξη | Υπέργειο τμήμα |
| V 02 | <i>Mandragora officinarum</i> | Solanaceae | Πάρος | 2013 | Άνοιξη | Καρπός |
| V 03 | <i>Athamanta densa</i> Boiss. and Orph. | Apiaceae | Παρνασσός | 2013 | Άνοιξη | Υπέργειο τμήμα |
| V 04 | <i>Athamanta densa</i> Boiss. and Orph. | Apiaceae | Παρνασσός | 2013 | Άνοιξη | Ρίζωμα |
| V 05 | <i>Echinophora tenuifolia</i> ssp. <i>sibthorpiana</i> (Guss.) Tutin | Apiaceae | Πάρος | 2013 | Καλοκαίρι | Υπέργειο τμήμα |
| V 06* | <i>Echinophora tenuifolia</i> ssp. <i>sibthorpiana</i> (Guss.) Tutin | Apiaceae | Πάρος | 2013 | Καλοκαίρι | Υπέργειο τμήμα |
| V 07 | <i>Smyrniium</i> sp. | Apiaceae | Λεονίδιο, Αρκαδία | | Άνοιξη | Υπέργειο τμήμα |
| V 08 | <i>Smyrniium</i> sp. | Apiaceae | Λεονίδιο, Αρκαδία | | Άνοιξη | Ρίζωμα |
| V 09 | <i>Salvia fruticosa</i> Mill. | Lamiaceae | Σύμη | 2013 | Άνοιξη | Υπέργειο τμήμα |
| V 10 | <i>Thymbra capitata</i> (L.) Cav. | Lamiaceae | Σύμη | 2013 | Άνοιξη | Υπέργειο τμήμα |
| V 11 | <i>Satureja juliana</i> L. | Lamiaceae | Σύμη | 2013 | Άνοιξη | Υπέργειο τμήμα |
| V 12 | <i>Origanum onites</i> L. | Lamiaceae | Σύμη | 2013 | Άνοιξη | Υπέργειο τμήμα |
| V 13 | <i>Anthemis chia</i> L. | Asteraceae | Σύμη | 2013 | Άνοιξη | Υπέργειο τμήμα |
| V 14 | <i>Foeniculum vulgare</i> Mill. | Apiaceae | Άστρος, Κυνουρία | 2014 | Καλοκαίρι | Υπέργειο τμήμα |
| V 15 | <i>Vitex agnus-castus</i> L. | Lamiaceae | Άστρος, Κυνουρία | 2014 | Καλοκαίρι | Υπέργειο τμήμα |
| V 16 | <i>Satureja thymbra</i> L. | Lamiaceae | Πάρωνας | 2014 | Καλοκαίρι | Υπέργειο τμήμα |

* υποβλήθηκε σε όξινη υδροαπόσταξη

2.2. Μέθοδοι

2.2.1. Επεξεργασία φυτικού υλικού

Μετά τη συγκομιδή, το νωπό φυτικό υλικό καθαρίστηκε και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Πριν την υποβολή των φυτικών δειγμάτων σε υδρο-απόσταξη, ο χειρισμός- επεξεργασία τους έγινε ως ακολούθως:

Juniperus spp.

Για την περαιτέρω μελέτη της διαφοροποίησης των δειγμάτων κέδρου ως προς την απόδοση σε αιθέριο έλαιο, τη φυτοχημική του σύσταση, αλλά και τη βιολογική του δράση, το

φυτικό υλικό χωρίστηκε σε δύο τμήματα από τα οποία:

- 1) το πρώτο υποβλήθηκε σε απ' ευθείας υδρο-απόσταξη (ανεπεξεργαστο) και
- 2) το δεύτερο υποβλήθηκε σε υδρο-απόσταξη, αφού πρώτα επεξεργάστηκε ως εξής:
 - α) τα φύλλα τεμαχίστηκαν σε μικρά τεμάχια (επεξεργασμένο) και
 - β) οι καρποί θρυμματίστηκαν (επεξεργασμένο) (**Πίνακας 2.1**).

Citrus spp.

- 1) Οι καρποί των εσπεριδοειδών τεμαχίστηκαν σε μικρούς κύβους.
- 2) Τα βιομηχανικής προέλευσης αιθέρια έλαια υποβλήθηκαν σε απ' ευθείας υδρο-απόσταξη.

Αρωματικά - Αρτυματικά φυτά:

Το φυτικό υλικό τεμαχίστηκε σε τεμάχια των 1-2 εκατοστών και στη συνέχεια υποβλήθηκε σε υδρο-απόσταξη.

2.2.2. Παραλαβή αιθερίων ελαίων

Κρυο-συμπίεση

Τα βιομηχανικής προέλευσης αιθέρια έλαια προέκυψαν με την εφαρμογή της μεθόδου της κρυο-συμπίεσης σε βιομηχανική κλίμακα. Κατά τη διαδικασία αυτή, οι καρποί των φρούτων πέρασαν μέσω μιας τραχείας επιφάνειας με αποτέλεσμα να διαρραγούν οι ελαιοφόροι αδένες των φλοιών τους. Στη συνέχεια, συνθλίφθηκαν υπό υψηλή πίεση για να απελευθερωθεί ο χυμός και τα αιθέρια έλαια. Τα αιθέρια έλαια διαχωρίστηκαν από τον χυμό με φυγοκέντρηση και παραλήφθηκαν (Arce and Soto 2008).

Κλασική υδρο-απόσταξη

Το νωπό φυτικό υλικό των τριών υπό μελέτη ομάδων φυτικού υλικού, μετά την επεξεργασία του υποβλήθηκε σε κλασική υδρο-απόσταξη. Κατά τη διαδικασία αυτή, το φυτικό υλικό τοποθετήθηκε σε συσκευή τύπου Clevenger (**Εικόνα 2.4**), παρουσία 3 λίτρων νερού, όπου αποστάχθηκε για περίπου 3 ώρες στους 100 °C (Evergetis et al., 2016). Για την παραλαβή των αιθερίων ελαίων χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης το n-πεντάνιο και, στη συνέχεια, τα αιθέρια έλαια που παραλήφθηκαν αφυδατώθηκαν με τη βοήθεια άνυδρου θειικού νατρίου (anhydrous Na₂SO₄) και αποθηκεύτηκαν υπό ήπια ψύξη (+4 °C).

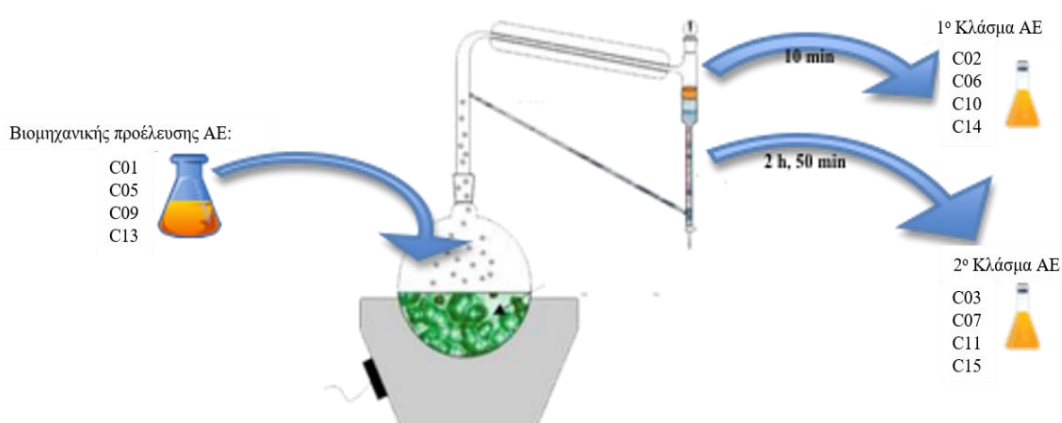


Εικόνα 2.4. Συσκευή υδρο-απόσταξης τύπου Clevenger

Κλασματοποίηση υδρο-απόσταξης

Τα βιομηχανικής προέλευσης αιθέρια έλαια των ειδών *Citrus* (που προέκυψαν με κρυοσυμπύεση) υποβλήθηκαν σε κλασική υδρο-απόσταξη κατά την οποία παραλήφθηκαν δύο κλάσματα όπως φαίνεται στο **Σχήμα 2.1**:

- 1) το 1^ο κλάσμα: προέκυψε κατά τα πρώτα 10 λεπτά της υδρο-απόσταξης,
- 2) το 2^ο κλάσμα: προέκυψε κατά τη διάρκεια των υπόλοιπων 2 ωρών και 50 λεπτών της υδρο-απόσταξης.



Σχήμα 2.1. Παραλαβή κλασμάτων υδρο-απόσταξης από τα βιομηχανικής προέλευσης αιθέρια έλαια

Οξίνη υδρο-απόσταξη

Η μεθοδολογία αυτή εφαρμόστηκε διερευνητικά σε δύο δείγματα, συγκεκριμένα στους καλοκαιρινούς καρπούς του *Juniperus drupacea* (Πίνακας 2.1) και στο *Ferulago sartori* (Πίνακας 2.3) για να αξιολογηθεί η διαφοροποίηση της απόδοσης και σύστασης των αιθερίων ελαίων που παραλαμβάνονται με τις δυο μεθόδους. Η μόνη διαφοροποίηση της μεθόδου σε σχέση με την κλασική υδρο-απόσταξη είναι η οξύτητα του νερού της απόσταξης. Ειδικότερα, στα 3 L H₂O προστέθηκαν 60 mL οξικού οξέος (C₂H₄O₂).

2.2.3. Προσδιορισμός της χημικής σύστασης των αιθερίων ελαίων

Ο ποιοτικός-ποσοτικός προσδιορισμός της χημικής σύστασης των αιθερίων ελαίων πραγματοποιήθηκε με Αέρια Χρωματογραφία συνδυασμένη με Φασματομετρία Μαζών (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS). Για τη χρωματογραφική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε συσκευή Αέριας Χρωματογραφίας Agilent Technologies 7890A, εξοπλισμένη με χρωματογραφική στήλη τύπου HP 5MS (30m x 0.25mm x 0.25μm). Η αρχική θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 60 °C και προγραμματίστηκε να φτάσει στους 280 °C, με ρυθμό αύξησης 3 °C ανά λεπτό. Οι θερμοκρασίες εισαγωγής και ανίχνευσης ρυθμίστηκαν στους 230 και 300 °C, αντίστοιχα. Ως αέριο μεταφοράς χρησιμοποιήθηκε το Ήλιο (He) με ρυθμό ροής 1 mL/min .

Τα φάσματα μάζας καταγράφηκαν σε Φασματογράφο Μάζας Agilent 5957C, VL συνδεδεμένο σε σειρά με την προηγούμενη χρωματογραφική διάταξη. Ο φασματογράφος αυτός είναι εξοπλισμένος με ανιχνευτή τριπλού άξονα και χρησιμοποιεί ως μέσο ιονισμού το ηλεκτρικό φορτίο (Electron Ionization). Η αναγνώριση των συστατικών στηρίχθηκε στα παρακάτω στοιχεία:

(α) τη σύγκριση με το Δείκτη Ανάσχεσης (Retention Index-RI) εκάστου συστατικού (Van den Dool and Kratz, 1963). Για τον υπολογισμό του δείκτη αυτού χρησιμοποιήθηκε ένα πρότυπο μίγμα κανονικών αλκανίων (C₅-C₂₄) και η σύγχρονη διεθνής βιβλιογραφία (Adams, 2007).

(β) το φάσμα μάζας του κάθε συστατικού, το οποίο και συγκρίθηκε με την χρήση εξειδικευμένων βάσεων δεδομένων (NIST/NBS, Wiley library spectra, κτλ), αλλά και την διαθέσιμη ειδική βιβλιογραφία (Adams, 1995; Massada, 1976).

(γ) σε σύγκριση με το χρόνο κατακράτησης εμπορικά διαθέσιμων μορίων.

2.2.4. Εκτροφή κουνουπιών

Η διατήρηση της εκτροφής των κουνουπιών του είδους *Ae. albopictus* για τις ανάγκες των πειραμάτων της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 25 ± 2 °C, σχετική υγρασία 80-90% και φωτοπερίοδο 16:8 ωρών (φως: σκοτάδι), στο Εργαστήριο Βιολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, στην Κηφισιά. Τα τέλεια κουνούπια διατηρήθηκαν σε κλωβούς ξύλινου σκελετού, διαστάσεων 33x33x33 εκ., επενδυμένων με πλέγμα διαστάσεων 32x32 εκατοστών. Ως πηγή τροφής χρησιμοποιήθηκαν τεμάχια βάμβακος εμποτισμένα σε σακχαρούχο διάλυμα 10%. Στα θηλυκά κουνούπια παρέχονταν γεύμα φρέσκου αίματος κοτόπουλου με το σύστημα Hemotek[®] (Hemotek[®] blood feeding system) προκειμένου να ωοτοκίσουν. Για τις ανάγκες της εκτροφής, εντός των κλωβών τοποθετήθηκαν πλαστικά λευκά δοχεία χωρητικότητας 250 mL τα οποία συμπληρώθηκαν με 100 mL νερό. Ως υπόστρωμα ωοτοκίας εντός των δοχείων τοποθετήθηκε λευκό διηθητικό χαρτί, στο οποίο προσκολλήθηκαν τα ωά από τα θηλυκά κουνούπια. Τα υποστρώματα με τα προσκολλημένα ωά αφέθηκαν εντός του κλωβού για μερικές ημέρες προκειμένου να συμπληρωθεί η εμβρυική ανάπτυξη. Στη συνέχεια, τα υποστρώματα ωοτοκίας τοποθετήθηκαν σε κυλινδρικά εμαγιέ δοχεία, διαμέτρου 35 cm και βάθους 10 cm, οι οποίες καλύφθηκαν με λεπτό τούλι. Για την εκκόλαψη των προνυμφών και την ανάπτυξή τους, προστίθετο ανά τακτά χρονικά διαστήματα επαρκής ποσότητα κατάλληλης ιχθυοτροφής (JBL Novo Tom 10% Artemia). Έτσι, με την χορήγηση άφθονης τροφής (ad libitum) σε κάθε λεκάνη αναπτύχθηκαν περίπου 400 προνύμφες έως και την έξοδο των τέλειων κουνουπιών. Τα τέλεια κουνούπια συλλέχθηκαν με αναρροφητήρα και οδηγήθηκαν στον κλωβό εκτροφής για τη συνέχιση του βιολογικού τους κύκλου.

2.2.5. Προσδιορισμός προνυμφοκτόνου δράσης

Τα αιθέρια έλαια αξιολογήθηκαν ως προς την προνυμφοκτόνο δράση τους κατά του *Ae. albopictus*. Για τον σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα των αιθερίων ελαίων σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-dimethyl sulfoxide) περιεκτικότητας 10 % w/v, τα οποία διατηρήθηκαν σε ήπια ψύξη έως την πειραματική αξιολόγηση της τοξικότητάς τους.

Η πειραματική μεθοδολογία που ακολουθήθηκε είναι -με μερικές τροποποιήσεις- η προτεινόμενη από τον Π.Ο.Υ. για τον έλεγχο της ευαισθησίας ή της ανθεκτικότητας των προνυμφών των κουνουπιών στα διάφορα εντομοκτόνα (WHO, 1981; WHO 2005). Συγκεκριμένα, 20 προνύμφες ανεπτυγμένης 3^{ης} προς 4^{ης} νεαρής ηλικίας, που απομονώθηκαν μηχανικά από εξειδικευμένους επιστήμονες από την εργαστηριακή εκτροφή του *Ae. albopictus*, τοποθετήθηκαν σε κυλινδρικό δοχείο με υδατικό διάλυμα περιεκτικότητας 2% v/v σε DMSO

(98 mL νερό δικτύου + 2 mL DMSO). Η προσθήκη του DMSO στο νερό συντέλεσε στην ομοιόμορφη κατανομή των οργανικών συστατικών σε υδατικό περιβάλλον. Μετά ακολούθησε η προσθήκη 29 μ L προτύπου διαλύματος αιθερίου ελαίου και ανάδευση μέχρι την ομογενοποίηση του τελικού διαλύματος. Για κάθε αιθέριο έλαιο που μελετήθηκε πραγματοποιήθηκαν τέσσερις επαναλήψεις, σε συνδυασμό με μία επέμβαση μάρτυρα που περιείχε 98 mL νερό δικτύου και 2 mL DMSO. Τα δοχεία με τις προνύμφες και το διάλυμα του αιθερίου ελαίου διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία 25 ± 2 °C, σχετική υγρασία $80\pm 2\%$ και φωτοπερίοδο 16:8 ωρών (φώς:σκόταδι). Η τοξική δράση των αιθερίων ελαίων προσδιορίστηκε με την καταγραφή της θνησιμότητας των προνυμφών 24 ώρες μετά την εφαρμογή. Κατά το διάστημα αυτό δεν χορηγήθηκε τροφή στις προνύμφες.

2.2.6. Προσδιορισμός απωθητικής δράσης

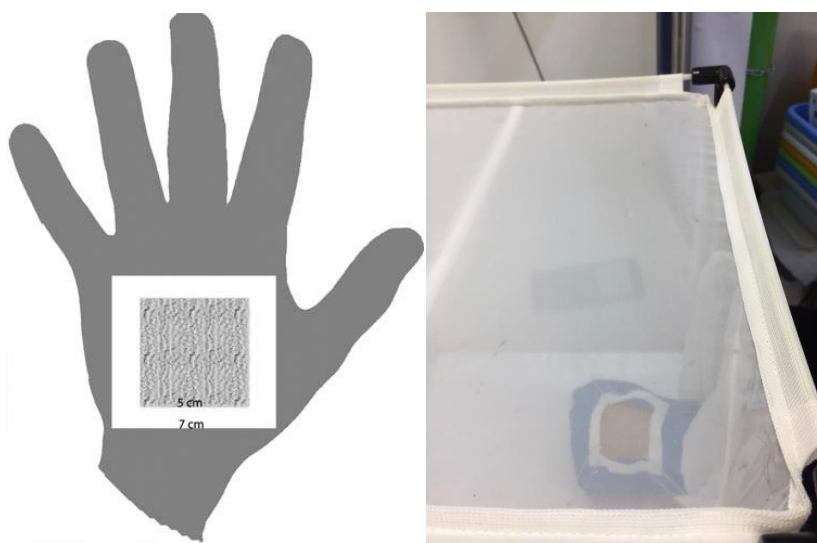
Τα αιθέρια έλαια μελετήθηκαν και ως προς την απωθητική τους δράση εναντίον των τελείων *Ae. albopictus*. Για τον σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα των αιθερίων ελαίων σε διγλωρομεθάνιο (DCM) περιεκτικότητας 10 % v/v, που διατηρήθηκαν σε ήπια ψύξη μέχρι την πειραματική αξιολόγηση της απωθητικής τους δράσης.

Για τη βιοδοκιμή της απωθητικότητας των αιθερίων ελαίων εναντίον των τελείων του *Ae. albopictus* ακολουθήθηκε πρωτόκολλο πειραματισμού (Giatropoulos et al., 2013) βασισμένο στον αριθμό των προσγειώσεων (land ings) των κουνουπιών στο ανθρώπινο δέρμα (Coleman et al. 1993, Govere and Durrheim 2006). Οι βιοδοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε ξύλινους κλωβούς (33x33x33 cm) με τις 3 πλευρές τους καλυμμένες με λεπτή σήτα (32x32 cm) και άνοιγμα διαμέτρου 20 cm στο πίσω μέρος, με υφασμάτινο «μανίκι» που επιτρέπει την είσοδο του χεριού του παρατηρητή, καθώς και την εισαγωγή και εξαγωγή υλικών, αποτρέποντας όμως την απόδραση των εντόμων. Σε κάθε κλωβό τοποθετήθηκαν 100 τέλεια *Ae. albopictus*, με αναλογία φύλου 1:1, ηλικίας 5-10 ημερών, στα οποία είχε διακοπεί η χορήγηση τροφής (ζαχαρόνευρο) για 12 ώρες. Ο διαχωρισμός των δύο φύλων έγινε μηχανικά και βασίζεται στο γεγονός ότι κατά κανόνα τα θηλυκά ακμαία *Ae. albopictus* είναι κατά τι μεγαλύτερα από τα αρσενικά. Η διατήρηση των κλωβών και η διενέργεια των βιοδοκιμών πραγματοποιήθηκαν σε χώρους ελεγχόμενων συνθηκών θερμοκρασίας ($25\pm 2^\circ\text{C}$), φωτοπεριόδου (16Φ:8Σ) και σχετικής υγρασίας (70-80%).

Για τις ανάγκες των βιοδοκιμών χρησιμοποιήθηκε πλαστικό γάντι στην πάνω πλευρά του οποίου και στο ύψος του καρπού υπήρχε άνοιγμα διαστάσεων 5 x 5 cm, περιμετρικά του οποίου τοποθετήθηκε διηθητικό χαρτί (Whatman chromatography paper) συνολικής επιφάνειας 24 cm² (Εικόνα 2.5). Το γάντι με το διηθητικό χαρτί, που έφερε την επιθυμητή

δόση κάθε ουσίας εισήλθε εντός του κλωβού. Η αξιολόγηση της απωθητικότητας έγινε με την καταμέτρηση του αριθμού που προσγειώθηκε στην εκτεθειμένη περιοχή του δέρματος για διάστημα 5 λεπτών. Κάθε γάντι αποσυρόταν μετά από τη βιοδοκιμή.

Αρχικά, στην επιφάνεια του διηθητικού χαρτιού εφαρμόστηκαν διάφορες δόσεις του Deet (από 0,05 έως 1 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$) και βρέθηκε ότι για διάστημα 5 λεπτών παραμονής του χεριού εντός του κλωβού η ελάχιστη δόση για την οποία καταγράφηκαν 0 προσγειώσεις, ήταν περίπου 0,2 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$. Στη συνέχεια, η συγκέντρωση αυτή (0,2 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$) χρησιμοποιήθηκε για τη βιοδοκιμή των αιθερίων ελαίων, κατά την οποία τοποθετήθηκαν στο διηθητικό χαρτί 50 μL πρότυπου διαλύματος αιθερίου ελαίου, το οποίο αφέθηκε για 5 λεπτά προκειμένου να εξατμιστεί ο διαλύτης και στη συνέχεια τοποθετήθηκε στο γάντι. Μετά, το γάντι με το διηθητικό χαρτί εισήλθαν εντός του κλωβού για διάστημα 5 λεπτών. Χρησιμοποιήθηκε τόσο θετικός μάρτυρας αναφοράς με το Deet (positive control), όσο και μάρτυρας (control) μόνο με την εφαρμογή του διαλύτη (DCM) επί του διηθητικού χαρτιού. Κάθε επέμβαση επαναλήφθηκε 8 φορές ($n=8$), ενώ χρησιμοποιήθηκαν 4 διαφορετικοί εθελοντές για την εξαγωγή ασφαλών αποτελεσμάτων.



Εικόνα 2.5. Βιοδοκιμή απωθητικής δράσης βασισμένη στον αριθμό των προσγειώσεων των κουνουπιών στο ανθρώπινο δέρμα (human land ing counts). Πλαστικό γάντι με άνοιγμα (5×5 cm) στην πάνω επιφάνεια με τοποθετημένο περιμετρικά διηθητικό χαρτί συνολικής επιφάνειας 24 cm^2 , εμποτισμένο με το υπό μελέτη αιθέριο έλαιο.

2.2.7. Στατιστική επεξεργασία

Η προνυμφοκτόνος δράση καταγράφηκε 24 ώρες μετά τον εμβολιασμό του διαλύματος καθενός από τα υπό μελέτη αιθέρια έλαια και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως το μέσο ποσοστό των θανατωμένων προνυμφών. Η προνυμφοκτόνος δράση των αιθερίων ελαίων

ταξινομήθηκε σε “χαμηλή”, “μέτρια” και “πολύ καλή” όταν τα ποσοστά θνησιμότητας των προνυμφών κυμαίνονταν μεταξύ 0-50 %, 50-80 % και 80-100 % αντίστοιχα. Στη βιοδοκιμή της απωθητικής δράσης των αιθερίων ελαίων έναντι των τελείων *Ae. albopictus* καταμετρήθηκε ο αριθμός των κουνουπιών που προσγειώθηκαν χωρίς να πραγματοποιηθεί αιμοληψία στην εκτεθειμένη περιοχή του δέρματος για διάστημα 5 λεπτών. Τα δεδομένα της προνυμφοκτόνου δράσης (μέσο ποσοστό θνησιμότητας προνυμφών) και της απωθητικής δράσης στα τέλεια κουνούπια (αριθμός προσγειώσεων κουνουπιών) αναλύθηκαν με το μη-παραμετρικό τεστ των Kruskal-Wallis (Sokal and Rohlf, 1995). Εφ’ όσον διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές ($P < 0,05$) για επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$, πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις ανά 2 με το τεστ U των Mann-Whitney (Sokal and Rohlf, 1995). Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου SPSS version 21.

Κεφάλαιο 3.

Αποτελέσματα και Συζήτηση

3.1. Φυσικά βιοκτόνα από την αυτοφυή βιοποικιλότητα

3.1.1. Χημική σύσταση

Στον Πίνακα 3.1.1 παρουσιάζονται οι αποδόσεις των 33 αιθερίων ελαίων όπως προέκυψαν από την υδρο-απόσταξη των δειγμάτων της διατριβής που παραλήφθηκαν από την επεξεργασία των ειδών *Juniperus phoenicea* και *Juniperus drupacea*.

Πίνακας 3.1.1. Αποδόσεις αιθερίων ελαίων των δύο ειδών *Juniperus*.

| Κωδικός | Είδος | Εποχή Συλλογής | Μέρος Φυτού | Βάρος φυτικού μέρους που αποστάχθηκε (g) | Απόδοση ΑΕ (mL/kg) | |
|---------|----------------------------|---------------------------|-----------------|--|--------------------|------|
| J 01 | <i>Juniperus phoenicea</i> | Χειμώνας | Φύλλα | 698 | 0,86 | |
| J 02* | | | 600 | 1,33 | | |
| J 03 | | | Ανώριμοι καρποί | 481 | 3,12 | |
| J 04* | | | 643 | 13,84 | | |
| J 05 | | | Ωριμοι καρποί | 476 | 1,05 | |
| J 06* | | | 679 | 15,76 | | |
| J 07 | | Άνοιξη | Φλοιός | 203 | 0,49 | |
| J 08* | | | 411 | 0,24 | | |
| J 09 | | | Φύλλα | 325 | 0,92 | |
| J 10* | | | 756 | 1,59 | | |
| J 11* | | | Ανώριμοι καρποί | 262 | 4,20 | |
| J 12 | | | Φλοιός | 519 | 0,19 | |
| J 13* | | | 408 | 0,25 | | |
| J 14 | Καλοκαίρι | Φύλλα | 365 | 1,37 | | |
| J 15* | | 471 | 1,70 | | | |
| J 16 | | Ανώριμοι καρποί | 192 | 1,56 | | |
| J 17* | | 484 | 6,61 | | | |
| J 18 | | <i>Juniperus drupacea</i> | Χειμώνας | Φύλλα | 339 | 1,47 |
| J 19* | | | | 369 | 1,36 | |
| J 20 | | | | Ανώριμοι καρποί | 360 | 0,28 |
| J 21* | | | | 707 | 1,84 | |
| J 22 | | | | Ωριμοι καρποί | 169 | 0,59 |
| J 23* | | | | 369 | 3,79 | |
| J 24 | Άνοιξη | | Φλοιός | 180 | 2,22 | |
| J 25 | | | Φύλλα | 462 | 1,30 | |
| J 26* | | | 506 | 1,38 | | |
| J 27 | | | Ανώριμοι καρποί | 473 | 0,21 | |
| J 28* | Καλοκαίρι | Φύλλα | 374 | 0,80 | | |
| J 29 | | | 293 | 1,71 | | |
| J 30* | | | 359 | 0,84 | | |
| J 31 | | Ανώριμοι καρποί | 578 | 0,52 | | |
| J 32* | | | 639 | 1,88 | | |
| J 33** | | | 551 | 1,45 | | |

* επεξεργασμένο (θρυμματισμένο) φυτικό υλικό

** επεξεργασμένο (θρυμματισμένο) φυτικό υλικό / υποβλήθηκε σε όξινη απόσταξη

Τα αιθέρια αυτά έλαια λόγω χαμηλής απόδοσης αποκλείστηκαν από τις βιοδοκιμές

Οι χαμηλές αποδόσεις που καταγράφηκαν για τα περισσότερα αιθέρια έλαια των φλοιών των κέδρων οδήγησαν στον αποκλεισμό τους από την περαιτέρω μελέτη της χημικής σύστασης και της βιοδραστικότητάς τους. Επιπλέον, για τον ίδιο λόγο (χαμηλές αποδόσεις <0,6 mL/kg) αποκλείστηκαν και τα αιθέρια έλαια των ανεπεξέργαστων ώριμων και ανώριμων χειμερινών καρπών του φυτού *Juniperus drupacea*, καθώς και των ανεπεξέργαστων ανοιξιάτικων καρπών του ίδιου είδους (**Πίνακας 1.3.1**). Οι αποδόσεις των υπόλοιπων 25 αιθερίων ελαίων κυμάνθηκαν από 0,80 mL/kg έως 15,76 mL/kg. Γενικά, οι αποδόσεις των αιθερίων ελαίων του είδους *J. phoenicea* (0,86-15,76 mL/kg) ήσαν υψηλότερες σε σύγκριση με του είδους *J. drupacea* (0,80-3,79 mL/kg).

Στον **Πίνακα 3.1.2** παρουσιάζονται τα κύρια φυτοχημικά συστατικά των αιθερίων ελαίων του είδους *J. phoenicea* όπως προέκυψαν από τη σχετική ανάλυση με χρήση αέριας χρωματογραφίας συνδυασμένης με φασματομετρία μαζών (GC/GC-MS). Αντίστοιχα, στον **Πίνακα 3.1.3** παρουσιάζονται τα κύρια συστατικά των αιθερίων ελαίων του είδους *J. drupacea*. Τα αναλυτικά αποτελέσματα της ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης των αιθερίων ελαίων των δύο ειδών παρατίθενται στο **Παράρτημα**. Συνολικά, κατά τις αναλύσεις αυτές ανιχνεύτηκε η παρουσία 52 φυτοχημικών συστατικών, εκ των οποίων τα 44 προσδιορίστηκαν στα αιθέρια έλαια του *J. phoenicea* και τα 20 στα αιθέρια έλαια του *J. drupacea*. Τα μόρια αυτά αντιπροσωπεύουν αντιστοίχως το 74,98-99,95% και 93,20-99,96% του συνόλου των φυτοχημικών που ανιχνεύονται στα έλαια αυτά. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι οι μονοτερπενικοί υδρογονάνθρακες αποτελούν την κύρια ομάδα συστατικών στο σύνολο των αιθερίων ελαίων που μελετήθηκαν. Άλλα συστατικά των οποίων η παρουσία ανιχνεύτηκε στα αιθέρια αυτά έλαια ήταν οξυγονωμένα μονοτερπένια, σεσκιτερπένια, οξυγονωμένα σεσκιτερπένια και οξυγονωμένα διτερπένια.

Στα αιθέρια έλαια των φύλλων του *J. phoenicea* ως κυρίαρχο συστατικό προσδιορίστηκε το α -πινένιο (21,76-59,64%) ακολουθούμενο από τα μόρια: β -φυλλανδρένιο (7,33-30,37%), α -τερπινυλόλη οξικός εστέρας (0-15,35%), μυρκένιο (5,23-8,93), α -φυλλανδρένιο (1,58-6,70%), α -τερπινεόλη (1,12-6,13%) και πιπεριτόνη (0-5,84%). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν εν μέρει με προηγούμενες μελέτες που αναφέρουν ως κύρια συστατικά των αιθερίων ελαίων των φύλλων του *J. phoenicea* τα μόρια: α -πινένιο, μυρκένιο, β -φυλλανδρένιο, Δ -3-καρένιο, οξικός εστέρας της α -τερπινυλόλης (Adams et al. 1996; Ennajjar et al., 2009, 2011; Medini et al., 2009; Derwich et al., 2010; Vourlioti-Arapi et al., 2012; Giatropoulos et al., 2013) και α -κεδρόλη (El-Sawi et al., 2007; Harhour et al., 2018), με κυρίαρχο το α -πινένιο. Εξαίρεση αποτελεί το αιθέριο έλαιο των φύλλων του *J. phoenicea* από την παραλία του Μαραθώνα, στο οποίο κυριαρχούσε το λεμονένιο (Vourlioti-Arapi et al.,

2012). Στα αιθέρια έλαια των φύλλων που μελετήθηκαν δεν ανιχνεύτηκε η α -κεδρόλη, ενώ το ποσοστό του Δ -3-καρένιου δεν ξεπέρασε το 0,87%. Η υψηλή περιεκτικότητα (>5%) σε α -τερπινεόλη και πιπεριτόνη σε αιθέρια έλαια που προέρχονται από φύλλα του *J. phoenicea* δεν έχει αναφερθεί προηγουμένως.

Τα αιθέρια έλαια των καρπών του *J. phoenicea* κυριαρχούνται από τα μόρια α -πινένιο (31,12-77,26%), β -φυλλανδρένιο (1,97-18,11%), α -τερπινεόλη (trace-8,21%), Δ -3-καρένιο (trace-8,21%), γερμακρένιο D (0,68-6,59%), μυρκένιο (2,48-6,39%) και 1- β -πινένιο (2,32-5,72%). Αξιοσημείωτα είναι και τα υψηλά ποσοστά των συστατικών α -καμφολένιο (5,09%), π -μενθα-1,5-διεν-8-όλη (5,02%) και *trans*- π -μενθ-2-εν-1,8-διόλη (5,33%) στα αιθέρια έλαια των ανεπεξέργαστων ώριμων καρπών. Το α -πινένιο αναφέρεται ως το κυρίαρχο συστατικό στις περισσότερες μελέτες σύστασης των αιθερίων ελαίων καρπών του *J. phoenicea* (Angioni et al. 2003; El-Sawi et al., 2007; Ennajjar et al., 2009; Medini et al., 2011; Vourlioti-Arapi et al., 2012; Koutsaviti et al., 2017; Harhour et al., 2018), ενώ ως κύρια συστατικά έχουν επίσης αναφερθεί τα: Δ -3-carene (Angioni et al. 2003; Ennajjar et al. 2009; Medini et al., 2011; Vourlioti-Arapi et al., 2012; Harhour et al., 2018), σαμπινένιο, β -πινένιο (El-Sawi et al., 2007), β -φυλλανδρένιο (Angioni et al. 2003; El-Sawi et al., 2007), μυρκένιο (Angioni et al. 2003), γ -καδινένιο (Ennajjar et al. 2009), καμφένιο, *trans*-βερμπενόλη (Medini et al., 2011), γερμακρένιο D (Koutsaviti et al., 2017) και α -κεδρόλη (Vourlioti-Arapi et al., 2012; Harhour et al., 2018). Τα συστατικά α -καμφολένιο, π -μενθα-1,5-διεν-8-όλη και *trans*- π -μενθ-2-εν-1,8-διόλη που ανιχνεύτηκαν στα αιθέρια έλαια των ανεπεξέργαστων ώριμων καρπών του *J. phoenicea*, καταγράφονται για πρώτη φορά σε τόσο υψηλά ποσοστά (>5%).

Σε αντίθεση με τα αιθέρια έλαια των φύλλων του *J. phoenicea*, στα οποία κυρίαρχο συστατικό είναι το α -πινένιο, τα αιθέρια έλαια των φύλλων του *J. drupacea*, κυριαρχούνται από το μονοτερπενικό υδρογονάνθρακα λεμονένιο (41,58-72,65%). Ακολουθούν το α -πινένιο (8,85-19,16%), το γερμακρένιο-D (2,55-11,65%) και το Δ -3-καρένιο (2,57-8,57%). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με αυτά άλλων μελετών που αναφέρουν ως κυρίαρχα συστατικά των αιθερίων ελαίων των φύλλων του *J. drupacea* το λεμονένιο, το α -πινένιο, το Δ -3-καρένιο (Adams, 1997; Sezik et al. 2009; Vourlioti-Arapi et al., 2012) και το γερμακρένιο-D (Vourlioti-Arapi et al., 2012). Όσον αφορά τη σύσταση των αιθερίων ελαίων των καρπών αυτού του είδους, το α -πινένιο ανιχνεύτηκε ως κυρίαρχο συστατικό στην πλειοψηφία των αιθερίων ελαίων (24,32-49,04%), ακολουθούμενο από το λεμονένιο (28,14- 55,44%) και το γερμακρένιο-D (3,28- 20,08%). Μελέτες για τη χημική σύσταση των αιθερίων ελαίων που προέρχονται από καρπούς αυτοφυών στην Ελλάδα ειδών *J. drupacea* αναφέρουν επίσης ως κύρια συστατικά αυτών των ελαίων τα: α -πινένιο, λεμονένιο και γερμακρένιο-D (Vourlioti-

Arapi et al., 2012; Koutsaviti et al., 2017). Αξιοσημείωτη είναι και η υψηλή περιεκτικότητα στο οξυγονωμένο διτερπένιο τοταρόλη (5,8%) που αναφέρεται στη μελέτη της Koutsaviti et al. (2017). Η τοταρόλη ανιχνεύτηκε σε μικρότερα ποσοστά σε δύο από τα υπό διερεύνηση αιθέρια έλαια, προερχόμενα από τους επεξεργασμένους ανοιξιάτικους ανώριμους καρπούς (1,89%) και από την όξινη υδρο-απόσταξη των επεξεργασμένων καλοκαιρινών ανώριμων καρπών (1,03%).

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων, η σύσταση των αιθερίων ελαίων των δύο ειδών κέδρου που μελετήθηκαν προσδίδει σε κάθε ένα από αυτά μία ιδιαίτερη χημική ταυτότητα. Η κύρια διαφορά μεταξύ των δύο ειδών έγκειται στην αντικατάσταση των ισομερών του φελλανδρενίου, τα οποία ανιχνεύτηκαν σε μεγάλα ποσοστά στα αιθέρια έλαια του φυτού *J. phoenicea*, από το λεμονένιο που αποτελεί το κυρίαρχο συστατικό στα περισσότερα αιθέρια έλαια του *J. drupacea*. Ωστόσο, τόσο η απόδοση των αιθερίων ελαίων, όσο και η χημική τους σύσταση παρουσιάζει σημαντική μεταβλητότητα σε σχέση με την εποχή της συλλογής του φυτικού υλικού, το μέρος του φυτού και τη μηχανική επεξεργασία του πριν από τη διαδικασία της υδρο-απόσταξης. Οι παράγοντες αυτοί συζητούνται αναλυτικά στα επόμενα υποκεφάλαια.

Πίνακας 3.1.2. Κύρια συστατικά (<5%) των 13 αιθερίων ελαίων του είδους *Juniperus phoenicea*.

| Συστατικά | J 01 | J 02 | J 03 | J 04 | J 05 | J 06 | J 09 | J 10 | J 11 | J 14 | J 15 | J 16 | J 17 |
|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <i>α</i> -πινένιο | 50,59 | 53,59 | 60,52 | 77,26 | 31,12 | 70,45 | 59,64 | 43,82 | 63,72 | 21,76 | 32,05 | 48,69 | 57,58 |
| <i>l</i> -β-πινένιο | 3,51 | 4,46 | 5,72 | 4,00 | 2,78 | 4,85 | 1,49 | 1,64 | 2,80 | 1,71 | 2,28 | 2,32 | 3,43 |
| μυρκενίο | 7,95 | 8,93 | 6,39 | 5,63 | 2,48 | 3,99 | 5,23 | 5,98 | 4,14 | 7,36 | 7,90 | 5,45 | 5,24 |
| <i>α</i> -φυλλανδρένιο | 1,58 | 1,67 | | | | | 3,25 | 3,80 | | 6,70 | 5,99 | 2,82 | 1,41 |
| (+)-3-καρένιο | 0,87 | 0,87 | 1,17 | t | 2,69 | 2,85 | | | 8,21 | | | 3,90 | 5,08 |
| β- φελλανδρένιο | 8,83 | 7,33 | 3,66 | 2,63 | 2,21 | 3,74 | 17,21 | 19,60 | 1,97 | 28,38 | 30,37 | 18,11 | 8,27 |
| αλδεΐδη του <i>α</i> -καμφολενίου | 2,72 | 1,69 | | | 5,09 | 1,53 | t | 0,73 | | | t | | |
| π-μενθα-1,5-διεν-8-όλη | 0,68 | 0,55 | | | 5,02 | t | | | | | | | |
| <i>trans</i> -π-μενθ-2-εν-1,8-διόλη | | | 0,63 | | 5,33 | 1,36 | | 0,54 | | | | | |
| <i>α</i> -τερπινεόλη | 3,23 | 2,33 | 3,07 | t | | 1,93 | 1,12 | 1,58 | 0,87 | 2,67 | 6,13 | 8,21 | 3,05 |
| πιπεριτόνη | | | | | 1,67 | | 0,83 | 1,02 | | 5,84 | 1,92 | 1,98 | 0,56 |
| οξικός εστέρας της <i>α</i> -τερπινεόλης | | | 0,64 | | 0,64 | | 6,01 | 8,60 | 1,26 | 15,35 | 3,15 | | |
| γερμακρένιο-D | 0,65 | 0,65 | 4,43 | 5,47 | 0,68 | 0,88 | t | 1,02 | 6,59 | 1,07 | 0,70 | 1,48 | 5,69 |
| Σύνολο | 80,61 | 82,07 | 86,23 | 94,99 | 59,71 | 91,58 | 94,78 | 88,33 | 89,56 | 90,84 | 90,49 | 92,96 | 90,31 |

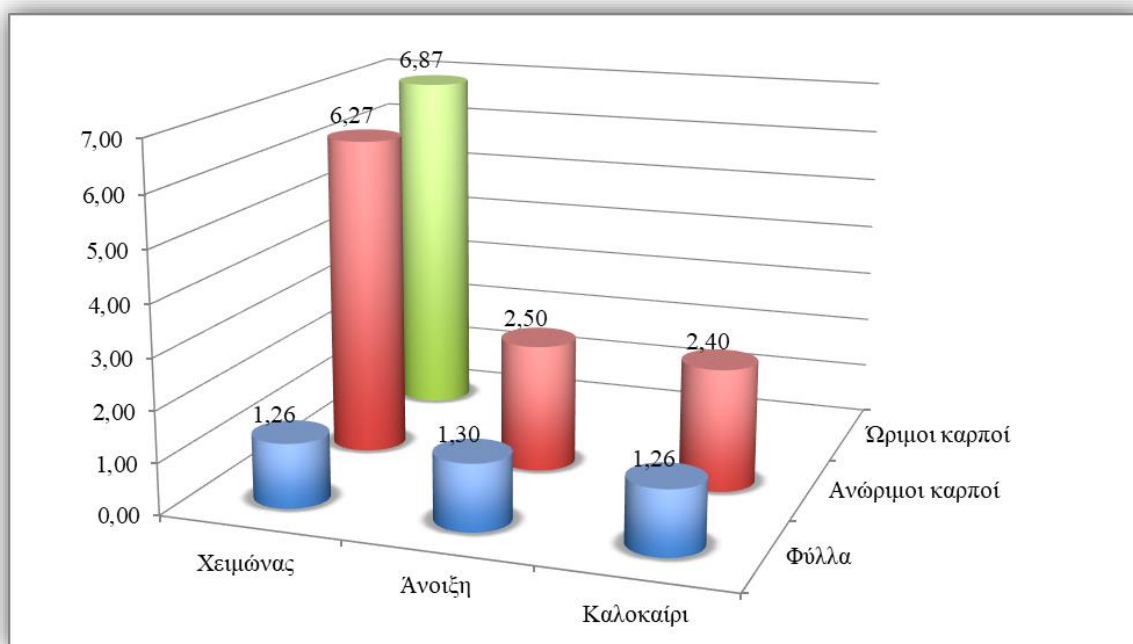
t: απαντώνται σε ίχνη

Πίνακας 3.1.3. Κύρια συστατικά (<5%) των 12 αιθερίων ελαίων του είδους *Juniperus drupacea*.

| Συστατικά | J 18 | J 19 | J 21 | J 23 | J 25 | J 26 | J 28 | J 29 | J 30 | J 31 | J 32 | J 33 |
|-------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <i>α</i> -πινένιο | 19,16 | 18,08 | 45,13 | 49,04 | 21,06 | 21,33 | 36,69 | 8,85 | 9,25 | 38,03 | 36,63 | 24,32 |
| (+)-3- καρένιο | 4,95 | 4,56 | | | 2,57 | 2,78 | | 8,57 | 8,53 | | | |
| λεμονένιο | 72,65 | 41,58 | 28,14 | 34,36 | 64,91 | 56,12 | 35,85 | 63,64 | 59,71 | 55,44 | 36,50 | 32,72 |
| γερμακρένιο-D | 3,11 | 6,30 | 12,72 | 5,26 | 2,55 | 5,65 | 9,24 | 8,66 | 11,65 | 3,28 | 16,19 | 20,08 |
| Σύνολο | 99,87 | 70,52 | 85,99 | 88,66 | 91,09 | 85,88 | 81,78 | 89,72 | 89,14 | 96,75 | 89,32 | 77,12 |

3.1.1.1. Εποχιακή διακύμανση

Η εποχή συλλογής (Χειμώνας, Άνοιξη, Καλοκαίρι) του φυτικού υλικού αρχικά μελετήθηκε ως προς τη μέση απόδοση των αιθερίων ελαίων, τα οποία προέρχονται από το ίδιο μέρος του φυτού (φύλλα, ώριμοι και ανώριμοι καρποί), στα οποία εφαρμόστηκαν όλες οι μέθοδοι επεξεργασίας. Με βάση τις μέσες αποδόσεις, οι οποίες παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 3.1.1**, οι ώριμοι καρποί αποδείχθηκαν ως το καταλληλότερο φυτικό μέρος για την παραλαβή του αιθερίου ελαίου στην υψηλότερη δυνατή απόδοση, ακολουθούμενοι από τους χειμερινούς ανώριμους καρπούς. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διακύμανση στις αποδόσεις των αιθερίων ελαίων που απομονώνονται από τα φύλλα, ανεξάρτητα από την εποχή της συλλογής τους. Αντίστοιχη μηδαμινή μεταβλητότητα παρουσίασαν και οι αποδόσεις των αιθερίων ελαίων της ανοιξιάτικης και καλοκαιρινής συλλογής των ανώριμων καρπών, οι οποίες όμως υπερβαίνουν κατά 155,8 % την απόδοση των αντίστοιχων χειμερινών καρπών.

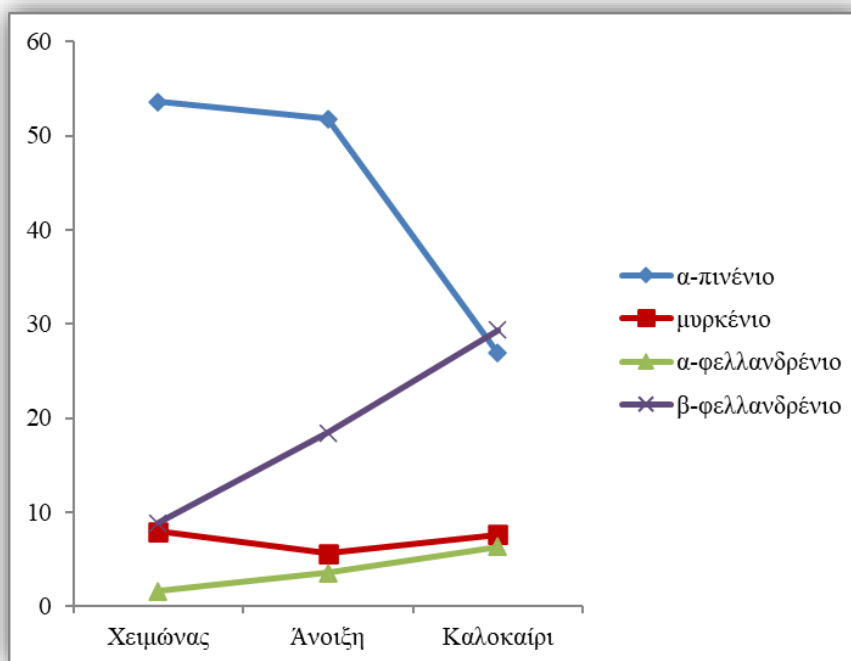


Διάγραμμα 3.1.1. Διακύμανση της μέσης απόδοσης των αιθερίων ελαίων (σε mL/kg) προερχόμενων από τα φύλλα, τους ανώριμους καρπούς και τους ώριμους καρπούς από τρεις εποχές συλλογής.

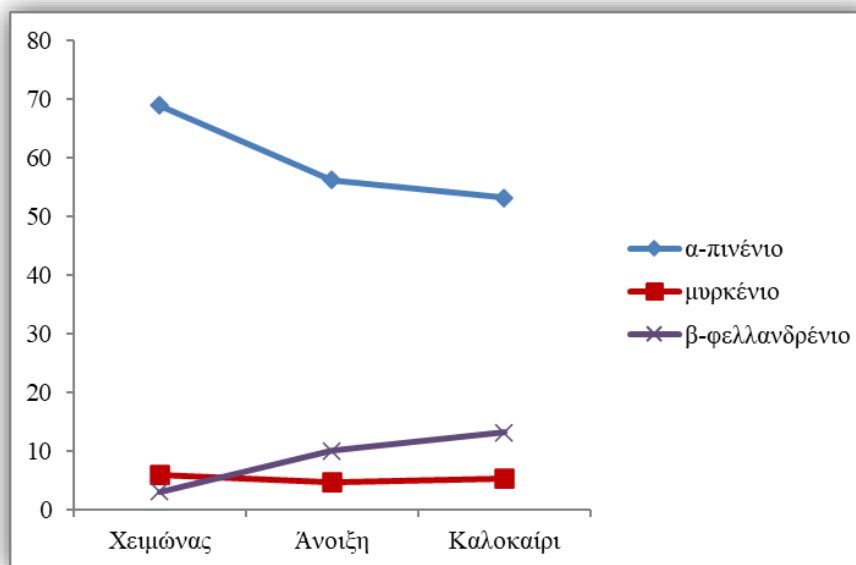
Ελάχιστες είναι οι έως σήμερα μελέτες που εξετάζουν την εποχιακή διακύμανση των αιθερίων ελαίων των κέδρων και αυτές εστιάζονται κυρίως στα αιθέρια έλαια που παραλαμβάνονται από τα φύλλα τους. Όσον αφορά την απόδοση του αιθερίου ελαίου των φύλλων, ο χειμώνας (Medini et al., 2009), καθώς και η περίοδος ανθοφορίας (Eppajar et al., 2011) έχουν συσχετιστεί με τη μέγιστη απόδοση αιθερίων ελαίων, παρ' ότι υπάρχει και μια

αναφορά (Sezik et al., 2009) που αναφέρει ότι δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ απόδοσης και εποχής συλλογής. Όσον αφορά την απόδοση των καρπών σε αιθέρια έλαια, οι Medini et al. (2011) παρέλαβαν αιθέρια έλαια από χειμερινούς ώριμους και ανώριμους καρπούς διαφορετικών πληθυσμών *J. phoenicea* στην Τυνησία. Αναφέρουν δε, ότι η χρήση ανώριμων καρπών οδηγεί σε υψηλότερες αποδόσεις αιθερίων ελαίων, εύρημα αντίθετο με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής.

Επιπλέον, στο πλαίσιο διενέργειας της διατριβής μελετήθηκε για πρώτη φορά και η εποχική διακύμανση των κύριων συστατικών των αιθερίων ελαίων που παραλαμβάνονται από τα φύλλα και τους ανώριμους καρπούς των δυο υπό μελέτη ειδών. Παρ' ότι προηγούμενες μελέτες για την εποχιακή διακύμανση των αιθερίων ελαίων των φύλλων των *J. phoenicea* (Medini et al., 2009; Ennajjar et al., 2011) και *J. drupacea* (Sezik et al., 2009) αποτέλεσαν βασικό υπόβαθρο για τη διενέργεια της μελέτης, αυτές δεν είχαν οδηγήσει στην αναγνώριση ενός συγκεκριμένου μοτίβου που να αντικατοπτρίζει την εποχική διακύμανση του χημικού περιεχομένου των αιθερίων ελαίων των φύλλων. Τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων που διενεργήθηκαν στο πλαίσιο της διατριβής, έδειξαν μια μείωση του α -πινενίου στα αιθέρια έλαια του είδους *J. phoenicea*, η οποία είναι αντίστοιχη με την αύξηση της θερμοκρασίας και της φωτοπερίόδου, κατά τη μετάβαση των εποχών από το χειμώνα προς στο καλοκαίρι. Το μοτίβο αυτό παρουσιάζεται αντεστραμμένο και για τα δύο ισομερή του φελλανδρενίου σε όλα τα αιθέρια έλαια που παραλαμβάνονται από τα φύλλα του φυτού. Αντίθετα, τα υπόλοιπα κύρια συστατικά παρουσιάζουν μια σταθερή συγκέντρωση κατά τις διαφορετικές εποχές. Όσον αφορά την εποχιακή διακύμανση των αιθερίων ελαίων των ανώριμων καρπών, παρατηρήθηκαν παρόμοια μοτίβα για τη συγκέντρωση του α -πινενίου και β -φελλανδρενίου, καθώς και για τα υπόλοιπα κύρια συστατικά. Η εποχιακή διακύμανση των κύριων συστατικών των αιθερίων ελαίων των φύλλων και ανώριμων καρπών του είδους *J. phoenicea* παρουσιάζεται στα **Διαγράμματα 3.1.2** και **3.1.3** αντίστοιχα.



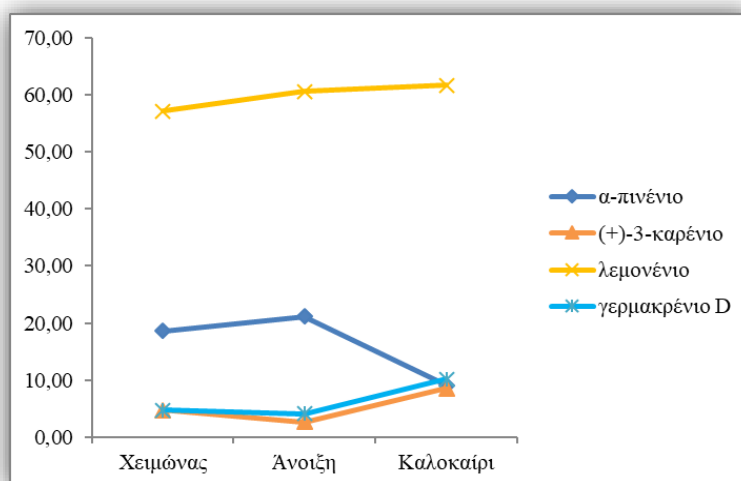
Διάγραμμα 3.1.2. Εποχιακή διακύμανση των κύριων συστατικών (>5%) των αιθερίων ελαίων των φύλλων *J. phoenicea*.



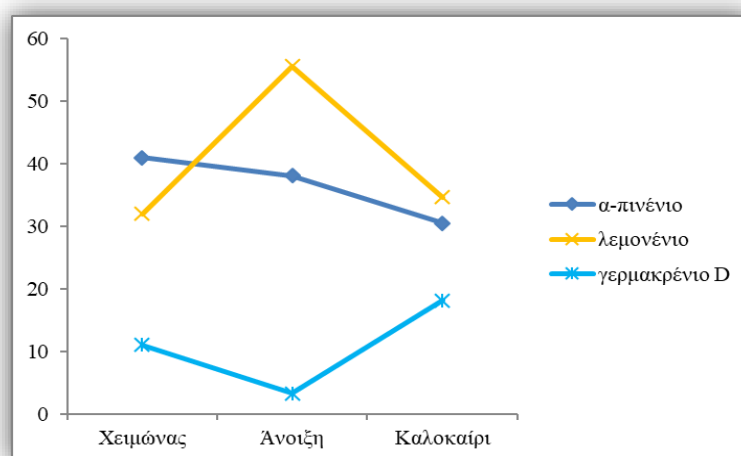
Διάγραμμα 3.1.3. Εποχιακή διακύμανση των κύριων συστατικών (>5%) των αιθερίων ελαίων των ανώριμων καρπών *J. phoenicea*.

Το μοτίβο της εποχιακής μείωσης του α-πινενίου που εμφανίζουν τα αιθέρια έλαια του *J. phoenicea*, παρατηρείται και για τα αιθέρια έλαια των φύλλων και ανώριμων καρπών *J. drupacea*. Επιπλέον, κατά τη μετάβαση από το χειμώνα προς το αλοκαίρι στα αιθέρια έλαια των φύλλων *J. drupacea* για τα συστατικά λεμονένιο, γερμακρένιο-D και (+)-3-καρένιο, παρατηρήθηκε αντίστοιχο μοτίβο αύξησης με αυτό των ισομερών του φελλανδρενίου στα

αιθέρια έλαια του *J. phoenicea*. Αντίθετα, η εποχιακή διακύμανση των κύριων συστατικών των αιθερίων ελαίων των ανώριμων καρπών *J. drupacea* παρατηρήθηκε ότι ακολουθεί ένα ιδιαίτερο-μοναδικό μοτίβο σε σχέση με τα αιθέρια έλαια που μελετήθηκαν. Ειδικότερα, το λεμονένιο και το γερμακρένιο-D εμφανίζουν διαφορετική τάση διακύμανσης ανάλογα με την εποχή. Η μέγιστη συγκέντρωση του λεμονενίου είναι την άνοιξη, και ξεπερνά κατά 66,8 % τη μέση τιμή των αντίστοιχων χειμερινών και καλοκαιρινών συγκεντρώσεων. Η διακύμανση του γερμακρενίου-D είναι αντίστροφη, αφού η ελάχιστη συγκέντρωση παρατηρείται στο ανοιξιάτικο αιθέριο έλαιο και είναι 77,5 % χαμηλότερη σε σύγκριση με τη μέση τιμή των αντίστοιχων χειμερινών και καλοκαιρινών συγκεντρώσεων. Η εποχιακή διακύμανση των κύριων συστατικών των αιθερίων ελαίων των φύλλων και ανώριμων καρπών του είδους *J. drupacea* παρουσιάζεται στα **Διαγράμματα 3.1.4** και **3.1.5** αντίστοιχα.



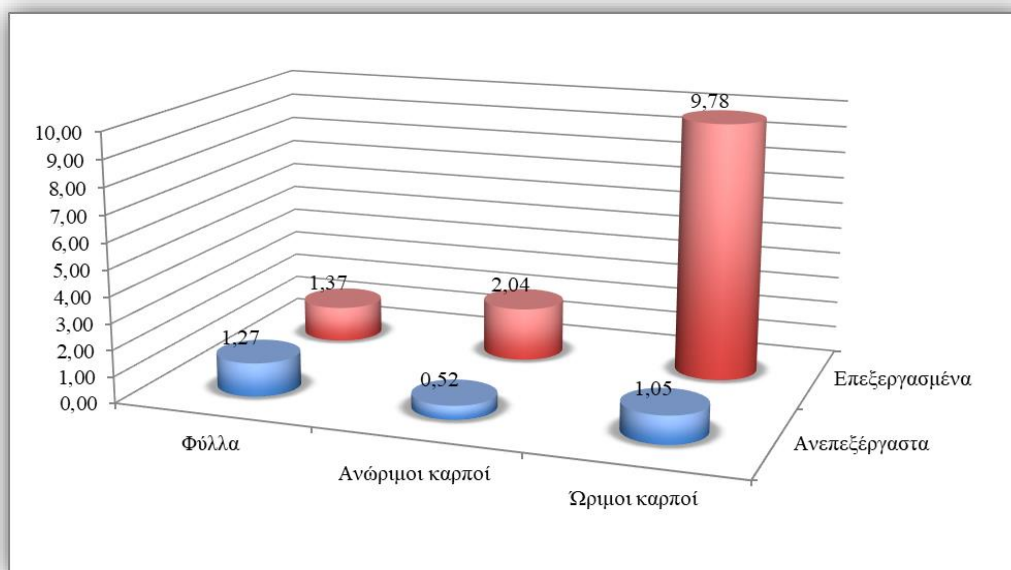
Διάγραμμα 3.1.4. Εποχιακή διακύμανση των κύριων συστατικών (>5%) των αιθερίων ελαίων των φύλλων *J. drupacea*.



Διάγραμμα 3.1.5. Εποχιακή διακύμανση των κύριων συστατικών (>5%) των αιθερίων ελαίων των ανώριμων καρπών *J. drupacea*.

3.1.1.2. Μεθοδολογία παραλαβής αιθερίων ελαίων

Η μεταβλητότητα στις αποδόσεις των αιθερίων ελαίων των δύο ειδών κέδρου μελετήθηκε και σε σχέση με τη μέθοδο επεξεργασίας που εφαρμόστηκε στα δείγματα που υποβλήθηκαν σε υδρο-απόσταξη. Ειδικότερα, μελετήθηκε -για όλα τα είδη και τις εποχές της συλλογής- η επίδραση της προ-επεξεργασίας (θρυμματισμένοι καρποί και τεμαχισμένα φύλλα) στη μέση απόδοση των αιθερίων ελαίων που προέρχονται από το ίδιο φυτικό μέρος. Σύμφωνα με τις μέσες αποδόσεις, που απεικονίζονται στο **Διάγραμμα 3.1.6**, οι επεξεργασμένοι (θρυμματισμένοι) ώριμοι καρποί αποδείχθηκαν ως το καταλληλότερο φυτικό υλικό για την εξασφάλιση υψηλής απόδοσης σε αιθέριο έλαιο. Η μέση απόδοση των αιθερίων ελαίων από επεξεργασμένους ώριμους καρπούς ξεπέρασε κατά 615,9% τη μέση απόδοση των αιθερίων ελαίων που προέρχονται από επεξεργασμένα (τεμαχισμένα) φύλλα και κατά 378,9% αυτή των επεξεργασμένων ανώριμων καρπών. Η επεξεργασία του φυτικού υλικού πριν από την υδρο-απόσταξη οδήγησε σε αύξηση της απόδοσης των αιθερίων ελαίων κατά 7,3% στα φύλλα, 292,6 % στους ανώριμους καρπούς και 830,7 % στους ώριμους καρπούς.



Διάγραμμα 3.1.6. Διακύμανση της μέσης απόδοσης των αιθερίων ελαίων (σε mL/kg) προερχόμενων από τρία διαφορετικά φυτικά μέρη και δύο μεθόδους επεξεργασίας.

3.1.2. Βιοδραστικότητα

Τα αιθέρια έλαια που παραλήφθηκαν από τα είδη *J. phoenicea* και *J. drupacea* αξιολογήθηκαν ως προς την προνυμφοκτόνο και απωθητική τους δράση έναντι του είδους κουνουπιών *Aedes albopictus*. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών, πέντε από τα

αιθέρια έλαια εμφάνισαν ισχυρή προνυμφοκτόνο δράση ενώ 11 παρουσίασαν απωθητική δράση συγκρίσιμη με αυτή του DEET (N,N-Diethyl-meta-toluamide), του πλέον δραστικού συνθετικού χημικού απωθητικού. Επιπλέον, θα πρέπει να επισημανθεί ότι τα αιθέρια έλαια που προέρχονται από τα καλοκαιρινά φύλλα του *J. phoenicea* (J14), καθώς και τα επεξεργασμένα χειμερινά και ανοιξιιάτικα φύλλα του *J. drupacea* (J19 και J25) εμφάνισαν ταυτόχρονα ισχυρή προνυμφοκτόνο και απωθητική δράση. Στα επόμενα υποκεφάλαια συζητούνται αναλυτικά τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών προνυμφοκτονίας και απωθητικότητας των υπό μελέτη αιθερίων ελαίων των κέδρων.

3.1.2.1. Προνυμφοκτόνα

Τα αιθέρια έλαια των δύο ειδών κέδρου μελετήθηκαν αρχικά ως προς την προνυμφοκτόνο τους δράση έναντι προνυμφών 3^{ης} - 4^{ης} ηλικίας του *Ae. albopictus*. Η μέση θνησιμότητα των προνυμφών 24 ώρες μετά την εφαρμογή των υπό μελέτη αιθερίων ελαίων των ειδών *J. phoenicea* και *J. drupacea* παρουσιάζονται αντίστοιχα στους Πίνακες 3.1.4 και 3.1.5. Η δράση των αιθερίων ελαίων ταξινομήθηκε σε «χαμηλή», «μέτρια» και «ισχυρή», ανάλογα με τα μέσα ποσοστά θνησιμότητας προνυμφών που προκαλούν και κυμαίνονται αντίστοιχα μεταξύ 0–50%, 50–80% και 80–100%.

Πίνακας 3.1.4. Τοξική δράση των αιθερίων ελαίων του *J. phoenicea* εναντίον προνυμφών 3^{ης} και 4^{ης} ηλικίας του *Aedes albopictus* εκφρασμένη ως μέσο ποσοστό νεκρών προνυμφών (\pm Τυπικό Σφάλμα Μέτρησης, Τ.Σ.Μ.) 24 ώρες μετά την εφαρμογή.

| Κωδικός | Μέσο ποσοστό (\pm Τ.Σ.Μ.) νεκρών προνυμφών | Ταξινόμηση |
|---------|---|------------|
| J01 | 0 \pm 0 | χαμηλή |
| J02 | 1 \pm 1 | χαμηλή |
| J03 | 4,00 \pm 2,92 | χαμηλή |
| J04 | 0 \pm 0 | χαμηλή |
| J05 | 2,00 \pm 1,22 | χαμηλή |
| J06 | 8,00 \pm 3,74 | χαμηλή |
| J09 | 0 \pm 0 | χαμηλή |
| J10 | 18,00 \pm 3,74 | χαμηλή |
| J11 | 26,00 \pm 2,45 | χαμηλή |
| J14 | 100 \pm 0 | ισχυρή |
| J15 | 90 \pm 0 | ισχυρή |
| J17 | 2 \pm 2 | χαμηλή |
| DMSO | 0 \pm 0 | |

DMSO: dimethyl sulfoxide (μάρτυρας)

Πίνακας 3.1.5. Τοξική δράση των αιθερίων ελαίων του *J. drupacea* εναντίον προνυμφών 3^{ης} και 4^{ης} ηλικίας του *Aedes albopictus* εκφρασμένη ως μέσο ποσοστό νεκρών προνυμφών (\pm Τυπικό Σφάλμα Μέτρησης, Τ.Σ.Μ.) 24 ώρες μετά την εφαρμογή.

| Κωδικός | Μέσο ποσοστό (\pm Τ.Σ.Μ.) νεκρών προνυμφών | Ταξινόμηση |
|---------|---|------------|
| J18 | 67,00 \pm 6,63 | μέτρια |
| J19 | 94 \pm 4 | ισχυρή |
| J21 | 26,00 \pm 6,78 | χαμηλή |
| J23 | 40,00 \pm 5,48 | χαμηλή |
| J25 | 96,00 \pm 2,45 | ισχυρή |
| J26 | 94 \pm 4 | ισχυρή |
| J29 | 6 \pm 4 | χαμηλή |
| J31 | 0 \pm 0 | χαμηλή |
| J32 | 12,00 \pm 5,83 | χαμηλή |
| J33 | 54,00 \pm 7,78 | μέτρια |
| DMSO | 0 \pm 0 | |

DMSO: dimethyl sulfoxide (μάρτυρας)

Από το σύνολο των αιθερίων ελαίων που παραλήφθηκαν για τις ανάγκες της διατριβής, λόγω χαμηλής απόδοσης δεν μελετήθηκε η προνυμφοκτόνος δράση των J16, J18, J30. Από τα 22 αιθέρια έλαια που μελετήθηκαν, τα 5 εμφάνισαν πολύ ισχυρή προνυμφοκτόνο δράση. Συγκεκριμένα, το J14 που προέρχεται από τα ανεπεξέργαστα φύλλα της καλοκαιρινής συλλογής του *J. phoenicea* παρουσίασε 100% αποτελεσματικότητα, ενώ ισχυρή δράση εμφάνισαν το J15 (επεξεργασμένα φύλλα της καλοκαιρινής συλλογής του *J. Phoenicea*) και τα J19, J25 και J26 από δείγματα φύλλων του *J. drupacea*. Αντιθέτως, τα J01, J04 και J09 του *J. phoenicea*, καθώς και το J31 από το *J. drupacea* δεν εμφάνισαν προνυμφοκτόνο δράση.

Η έρευνα της βιβλιογραφίας έδειξε ότι η προνυμφοκτόνος δράση των αιθερίων ελαίων του γένους *Juniperus* έχει μελετηθεί έναντι διαφορετικών κουνουπιών υγειονομικής σημασίας, παρουσιάζοντας υποσχόμενα αποτελέσματα (Prajapati et al., 2005; Amer and Mehlhorn, 2006b; Carroll et al. 2011; Vourlioti-Arapi et al., 2012; Giatropoulos et al., 2013; Dias and Moraes, 2014; Karunamoorthi et al., 2014). Η τοξική δράση αυτών των ελαίων, ωστόσο, έχει φανεί ότι επηρεάζεται από παράγοντες όπως το είδος, το φυτικό μέρος και το μικροκλίμα. Συγκεκριμένα, τα αιθέρια έλαια που παραλαμβάνονται από διαφορετικά φυτικά μέρη του *J. drupacea* εμφανίζουν ισχυρότερη δράση σε σύγκριση με τα αιθέρια έλαια του *J. phoenicea* έναντι του είδους *Culex ripiens*, με το ξύλο να εμφανίζεται ως το καταλληλότερο φυτικό τμήμα ακολουθούμενο από τα ανθισμένα φύλλα και τελευταίους τους καρπούς (Vourlioti-Arapi et al., 2012). Στην ίδια μελέτη τα αιθέρια έλαια των φύλλων του *J. phoenicea* έδειξαν ισχυρότερη δράση έναντι των αιθερίων ελαίων που προέρχονται από τους καρπούς. Τα τελευταία, σε άλλη μελέτη (Giatropoulos et al., 2013) που αφορούσε την τοξική τους δράση σε προνύμφες του *Aedes albopictus* παρουσίασαν τιμές LC₅₀ 55,5 mg/L και LC₉₀ 77,0 mg/L.

Τα αποτελέσματα της προνυμφοκτόνου δράσης των υπό μελέτη αιθερίων ελαίων συμφωνούν, γενικώς, με αυτά προηγούμενων μελετών, παρ' ότι εμφανίζουν σημαντική μεταβλητότητα επειδή η αξιολόγηση συμπεριέλαβε διαφορετικούς χημειότυπους, εποχές συλλογής, φυτικά τμήματα και τρόπους επεξεργασίας των δειγμάτων. Ειδικότερα, τα αιθέρια έλαια των φύλλων έδειξαν ότι διαθέτουν ισχυρότερη προνυμφοκτόνο δράση σε σύγκριση με τα αιθέρια έλαια των καρπών. Με βάση τη συνδυαστική μελέτη των αποτελεσμάτων της προνυμφοκτονίας και της διακύμανσης των κύριων συστατικών των αιθερίων ελαίων, η υψηλή τοξικότητα των J14 και J15 μπορεί να αποδοθεί στην υψηλή τους περιεκτικότητα σε α - και β -φελλανδρένιο. Αντίστοιχα ισχυρή δραστηριότητα είχε παρατηρηθεί και στο παρελθόν έναντι προνυμφών του *Culex pipiens* (Evergetis et al., 2013). Αντίθετα, η αυξημένη συγκέντρωση του α -πινένιου έχει συσχετιστεί αρνητικά με την προνυμφοκτόνο δράση (Vourlioti-Arapi et al., 2012), σχέση που ταιριάζει με τη χαμηλή τοξικότητα που παρουσίασαν τα αιθέρια έλαια με υψηλή περιεκτικότητα σε α -πινένιο (J01, J04, J09). Όσον αφορά τα αιθέρια έλαια του *J. drupacea*, η υψηλή τοξικότητα των J25 και J26 μπορεί αντίστοιχα να συνδεθεί με την υψηλή τους περιεκτικότητα σε λεμονένιο, όπως και την παρουσία άλλων συστατικών, όπως τα 1- β -πινένιο, μυρκένιο, (+)-3-καρένιο, α -κουμπεμπένιο, α -κοπαένιο, R-κουρκουμένιο και γ -καδινένιο. Η ισχυρή δράση του λεμονενίου έχει αναφερθεί σε αρκετές μελέτες τοξικότητας για την καταπολέμηση των προνυμφών των κουνουπιών (Michaelakis et al., 2008; Giatropoulos et al., 2012; Cheng et al., 2009). Αντίστοιχα ισχυρή δράση έχουν επίσης καταγραφεί για τα συστατικά 1- β -πινένιο (Michaelakis et al., 2009; Vourlioti-Arapi et al., 2012), μυρκένιο (Cheng et al., 2009; Vourlioti-Arapi et al., 2012), (+)-3-καρένιο (Cheng et al., 2009) και γ -καδινένιο (Michaelakis et al., 2008; Giatropoulos et al., 2012; Evergetis et al., 2013). Ο πιθανός ρόλος της συνεργιστικής δράσης των δευτερευόντων συστατικών για την εμφάνιση προνυμφοκτόνου δράσης στα αιθέρια έλαια των κέδρων έχει προταθεί πρόσφατα και από άλλους μελετητές (Vourlioti-Arapi et al., 2012).

3.1.2.2. Αποθητικά

Στους Πίνακες 3.1.6 και 3.1.7 συνοψίζονται τα αποτελέσματα της αποθητικής δράσης των αιθερίων ελαίων των ειδών *J. phoenicea* και *J. drupacea* αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος αριθμός προσγειώσεων των τελείων εντόμων του γένους *Aedes albopictus* στο ακάλυπτο τμήμα ενός εμποτισμένου με αιθέριο έλαιο γαντιού, μετά από 5 λεπτά έκθεσης. Συνολικά, τα 11 από τα 25 αιθέρια έλαια που μελετήθηκαν εμφάνισαν ισχυρή δράση (μέσος αριθμός προσγειώσεων <1) συγκρίσιμη με αυτήν του DEET (N,N-Diethyl-meta-

toluamide), του πλέον ισχυρού συνθετικού χημικού απωθητικού κουνουπιών. Θα πρέπει όμως να επισημανθεί ότι τα αιθέρια έλαια J02, J05, J16 και J17 που παραλαμβάνονται από το είδος *J. phoenicea* και τα J18, J19 και J30 του είδους *J. drupacea* εμφάνισαν 100 % απωθητικότητα (μηδενικές προσγειώσεις). Τα αιθέρια έλαια του *J. phoenicea* με ισχυρή προνυμφοκτόνο δράση περιείχαν ως κύριο συστατικό το α -πινένιο, ενώ το λεμονένιο ήταν το κυρίαρχο συστατικό στα αντίστοιχα έλαια του *J. drupacea*. Στην περίπτωση αυτή, η συνδυαστική μελέτη των αποτελεσμάτων της χημικής σύστασης και της απωθητικής δράσης, δεν έγινε δυνατόν να οδηγήσει σε μια αξιόπιστη συσχέτιση μεταξύ της απωθητικής δράσης και του φυτοχημικού περιεχομένου των αιθερίων ελαίων.

Πίνακας 3.1.6. Απωθητική δράση των αιθερίων ελαίων του *Juniperus phoenicea* εναντίον τελείων εντόμων *Aedes albopictus* εκφρασμένη ως μέσος αριθμός προσγειώσεων (\pm Τυπικό Σφάλμα Μέτρησης, Τ.Σ.Μ.) μετά από 5 λεπτά έκθεσης.

| Κωδικός | Μέσος αριθμός (\pm Τ.Σ.Μ) προσγειώσεων / 5 λεπτά | P_{DEET} | P_{DCM} |
|---------|---|------------|-----------|
| J01 | 1,63 \pm 0,63 | 0,0106* | 0,0007* |
| J02 | 0 \pm 0 | 1 | 0,0003* |
| J03 | 49,25 \pm 4,03 | 0,0003* | 0,1023 |
| J04 | 20,25 \pm 4,24 | 0,0003* | 0,0008* |
| J05 | 0 \pm 0 | 1 | 0,0003* |
| J06 | 9,75 \pm 5,67 | 0,0107* | 0,0008* |
| J09 | 9,38 \pm 1,64 | 0,0003* | 0,0026* |
| J10 | 0,13 \pm 0,13 | 0,3173 | 0,0005* |
| J11 | 1,13 \pm 0,67 | 0,0645 | 0,0006* |
| J14 | 0,25 \pm 0,25 | 0,3173 | 0,0005* |
| J15 | 1,88 \pm 0,52 | 0,0003* | 0,0006* |
| J16 | 0 \pm 0 | 1 | 0,0003* |
| J17 | 0 \pm 0 | 0,3173 | 0,0003* |
| DEET | 0 \pm 0 | - | - |
| DCM | 56 \pm 4 | - | - |

DEET: N,N-Diethyl-meta-toluamide (θετικός μάρτυρας)

DCM: dichloromethane (μάρτυρας)

* Σημαντική Διαφορά ($d.f. = 1, \alpha = 0.05$)

Οι προηγούμενες μελέτες που αναφέρονται στην απωθητική δράση αιθερίων ελαίων των ειδών *Juniperus* παρουσιάζουν μια μεγάλη ποικιλία αποτελεσμάτων. Η απωθητική δράση των αιθερίων ελαίων των ειδών *J. virginiana* και *J. communis* που έχει μελετηθεί εναντίον τριών διαφορετικών ειδών κουνουπιού (*Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* και *Culex quinquefasciatus*), έδειξε ότι παρέχουν πλήρη προστασία (0% ποσοστό προσγειώσεων και νυγμάτων μετά από έκθεση 2 λεπτών) έναντι του *Culex quinquefasciatus*, αλλά μειωμένη

προστασία (ποσοστό προσγειώσεων και νυγμάτων 0-6,8%) έναντι των άλλων δύο ειδών (Amer and Mehlhorn, 2006). Αντίθετα, τα αιθέρια έλαια του *J. macroroda* δεν παρουσιάζουν απωθητική δράση έναντι των προαναφερθέντων τριών ειδών κουνουπιού (Prajapati et al., 2005), ενώ ισχυρή δράση εμφανίζουν τα αιθέρια έλαια του *J. procera* έναντι του φορέα της ελονοσίας *Anopheles arabiensis* (Karunamoorthi et al., 2014). Σε δοκιμές απωθητικότητας των αιθερίων ελαίων των φυτών της Οικογένειας Cupressaceae, τα έλαια του *J. chinensis* δεν απώθησαν τα θηλυκά κουνούπια *Aedes aegypti* στη μέγιστη συγκέντρωση που μελετήθηκε (1,5 mg/cm²), ενώ αυτά του *J. communis* είχαν ως ελάχιστη αποτελεσματική δόση τα 0,06 mg/cm² (Carroll et al., 2011). Σε αντίστοιχη μελέτη, τα αιθέρια έλαια του *J. phoenicea* εμφάνισαν ισχυρή απωθητική δράση στην υψηλότερη συγκέντρωση που μελετήθηκε ($\approx 0,2$ mg/cm²), ενώ δεν ήταν αποτελεσματικά στη μικρότερη δόση ($\approx 0,08$ mg/cm²) (Giatropoulos et al., 2013).

Πίνακας 3.1.7. Απωθητική δράση των αιθερίων ελαίων του *Juniperus drupacea* εναντίον τελείων εντόμων του *Aedes albopictus* εκφρασμένη ως μέσος αριθμός προσγειώσεων (\pm Τυπικό Σφάλμα Μέτρησης, Τ.Σ.Μ.) μετά από 5 λεπτά έκθεσης.

| Κωδικός | Μέσος αριθμός (\pm Τ.Σ.Μ.) προσγειώσεων / 5 λεπτά | P_{DEET} | P_{DCM} |
|---------|--|------------|-----------|
| J18 | 0 \pm 0 | 1 | 0,0003* |
| J19 | 0 \pm 0 | 1 | 0,0003* |
| J21 | 16,00 \pm 6,09 | 0,0003* | 0,0013* |
| J23 | 0,88 \pm 0,88 | 0,3173 | 0,0005* |
| J25 | 0,25 \pm 0,16 | 0,1432 | 0,0006* |
| J26 | 20,14 \pm 5,73 | 0,0003* | 0,0013* |
| J28 | 24,88 \pm 4,21 | 0,0003* | 0,0008* |
| J29 | 40,38 \pm 3,01 | 0,0003* | 0,0002* |
| J30 | 0 \pm 0 | 1 | 0,0003* |
| J31 | 39,13 \pm 3,36 | 0,0003* | 0,0003* |
| J32 | 6,63 \pm 2,15 | 0,0003* | 0,0008* |
| J33 | 11,00 \pm 2,72 | 0,0003* | 0,0008* |
| DEET | 0 \pm 0 | - | - |
| DCM | 56 \pm 4 | - | - |

DEET: N,N-Diethyl-meta-toluamide (θετικός μάρτυρας)

DCM: dichloromethane (μάρτυρας)

* Σημαντική Διαφορά ($d.f. = 1, \alpha = 0.05$)

Η απωθητική δράση των αιθερίων ελαίων έχει γενικά συνδεθεί με την περιεκτικότητά τους σε μονοτερπένια και σεσκιτερπένια (Nerio et al., 2010). Ειδικότερα, αναφέρεται ότι οι αλδεϋδες, τα οξείδια και οι αλκοόλες παρουσιάζουν ισχυρότερη απωθητική δράση σε σχέση με

τους περισσότερους υδρογονάνθρακες (Weldon et al., 2011). Ωστόσο, οι μελέτες που αξιολογούν την απωθητική δράση αιθερίων ελαίων ειδών *Juniperus* έναντι των κουνουπιών δεν έχουν, μέχρι στιγμής, καταφέρει να συνδέσουν την απωθητική δράση με το φυτοχημικό τους περιεχόμενο. Όμως, η μελέτη των φυτοχημικών μορίων που εμπεριέχονται σε αιθέρια έλαια των κέδρων έχει δείξει ότι τα παρακάτω μόρια διαθέτουν απωθητική δράση έναντι διαφορετικών ειδών κουνουπιών: α) τα μονοτερπένια α -πινένιο, λεμονένιο, τερπινολένιο, μυρκένιο, 3-καρένιο, λιναλοόλη και γ -καδινένιο αναφέρονται συχνά στη βιβλιογραφία ως απωθητικά κουνουπιών (Hwang et al., 1985; Ibrahim and Zaki, 1998; Kline et al., 2003; Park et al., 2005; Yang et al., 2004; Omolo et al. 2004; Odalo et al., 2005; Park et al., 2005; Traboulsi et al., 2005; Jaenson et al., 2006;), β) τα σεσκιτερπένια β -καρνοφυλλένιο και το οξείδιο του καρνοφυλλενίου παρουσιάζουν απωθητική δράση έναντι των ειδών *Aedes aegypti* και *Anopheles gambiae* (Omolo et al., 2004; Odalo et al., 2005; Gillij et al., 2008). Οι τερπενοειδείς αυτές ενώσεις περιέχονται σε διαφορετικά ποσοστά στα υπό μελέτη αιθέρια έλαια, η κατανομή τους ωστόσο στα αιθέρια έλαια σε σχέση με τη διακύμανση της απωθητικής τους δράσης έναντι του *Aedes albopictus* δεν ακολουθεί κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο. Έτσι, η ισχυρή απωθητική δράση των υπό μελέτη αιθερίων ελαίων πιθανά οφείλεται στη συνεργιστική δράση μεταξύ των διαφόρων συστατικών τους. Η σημασία της συνέργειας μεταξύ των φυτοχημικών συστατικών στην απωθητική δράση των αιθερίων ελαίων έχει τονιστεί σε προηγούμενες μελέτες (Hummelbrunner and Isman, 2001; Omolo et al., 2004; Gillij et al., 2008).

3.2. Φυσικά βιοκτόνα από την αγροτική βιοποικιλότητα

3.2.1. Χημική σύσταση

3.2.1.1. Βιομηχανικά αιθέρια έλαια

Στον Πίνακα 3.2.1 παρουσιάζονται οι αποδόσεις των αιθερίων ελαίων, που εκφράζονται ως τα ποσοστά ανάκτησης των πτητικών κλασμάτων από τα βιομηχανικής προέλευσης αιθέρια έλαια (Β.Π.Α.Ε.). Από τα τέσσερα Β.Π.Α.Ε. που μελετήθηκαν, το πορτοκάλι (*C. sinensis*) παρουσίασε το μεγαλύτερο ποσοστό ανάκτησης από το πτητικό του κλάσμα (88,0%) και το λεμόνι (*C. limon*) το μικρότερο (74,0%). Σε όλες τις περιπτώσεις, οι αποδόσεις των αιθερίων ελαίων ήταν μεγαλύτερες στο πρώτο κλάσμα της υδρο-απόσταξης (τα πρώτα 15 λεπτά) σε σχέση με το δεύτερο (υπόλοιπες 2 ώρες και 45 λεπτά).

Πίνακας 3.2.1. Κωδικοί, δεδομένα προέλευσης και αποδόσεις των βιομηχανικής προέλευσης αιθερίων ελαίων (Β.Π.Α.Ε.) των τεσσάρων ειδών *Citrus* (1^ο Κλάσμα: πρώτα 15 λεπτά υδρο-απόσταξης, 2^ο Κλάσμα: υπόλοιπες 2 ώρες και 45 λεπτά).

| Είδος | Κωδικός | Προέλευση Δείγματος | Όγκος απόσταξης* – ανάκτησης (mL) | Απόδοση (% V/V)** |
|----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|-------------------|
| <i>C. paradisi</i> | C 01 | Β.Π.Α.Ε. | 50,0 | 0,4–0,6% |
| | C 02 | 1 ^ο Κλάσμα Β.Π.Α.Ε. | 23,2 | 46,4% |
| | C 03 | 2 ^ο Κλάσμα Β.Π.Α.Ε. | 18,5 | 37,0% |
| | Συνολικός όγκος κλάσματος ανάκτησης | | 41,7 | 83,4% |
| <i>C. limon</i> | C 05 | Β.Π.Α.Ε. | 20,0 | 0,4–0,6% |
| | C 06 | 1 ^ο Κλάσμα Β.Π.Α.Ε. | 8,3 | 41,5% |
| | C 07 | 2 ^ο Κλάσμα Β.Π.Α.Ε. | 6,5 | 32,5% |
| | Συνολικός όγκος κλάσματος ανάκτησης | | 14,8 | 74,0% |
| <i>C. reticulata</i> | C 09 | Β.Π.Α.Ε. | 25,0 | 0,4–0,6% |
| | C 10 | 1 ^ο Κλάσμα Β.Π.Α.Ε. | 10,8 | 43,2% |
| | C 11 | 2 ^ο Κλάσμα Β.Π.Α.Ε. | 10,1 | 40,4% |
| | Συνολικός όγκος κλάσματος ανάκτησης | | 20,9 | 83,6% |
| <i>C. sinensis</i> | C 13 | Β.Π.Α.Ε. | 25,0 | 0,4–0,6% |
| | C 14 | 1 ^ο Κλάσμα Β.Π.Α.Ε. | 12,0 | 48,0% |
| | C 15 | 2 ^ο Κλάσμα Β.Π.Α.Ε. | 10,0 | 40,0% |
| | Συνολικός όγκος κλάσματος ανάκτησης | | 22,0 | 88,0% |

* Όγκος του αντίστοιχου Β.Π.Α.Ε.

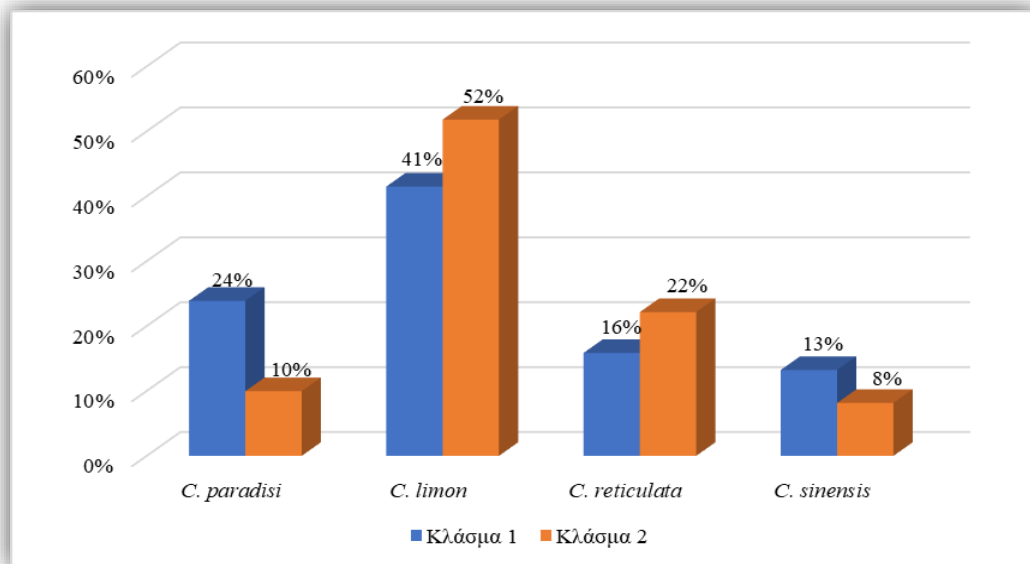
** Στην περίπτωση του Β.Π.Α.Ε., η βιομηχανική τιμή αντιστοιχεί σε % W/W του παραγόμενου χυμού

Στον **Πίνακα 3.2.2** παρουσιάζονται τα κύρια συστατικά (εμπεριέχονται σε ποσότητες >4%) των Β.Π.Α.Ε. για τα τέσσερα είδη *Citrus*, όπως προέκυψαν από τη φυτοχημική ανάλυση με Αέρια Χρωματογραφία και Φασματομετρία Μαζών (GC/GC-MS). Τα αναλυτικά αποτελέσματα της ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης των αιθερίων ελαίων των κитρωδών που μελετήθηκαν παρατίθενται στο **Παράρτημα**. Συνολικά, σε αυτά ανιχνεύτηκαν 30 φυτοχημικά συστατικά που αντιπροσωπεύουν από 73,89% έως 99,98% της σύστασης των αιθερίων ελαίων τους. Τα περισσότερα από αυτά είναι μονοτερπένια, κυρίως κυκλικά και σπανιότερα αλειφατικά. Στα αιθέρια έλαια που προέρχονται από τη χυμοποίηση των πορτοκαλιού (*C. sinensis*), γκρέιπφρουτ (*C. x paradisi*) και μανταρινιού (*C. reticulata*), ως κύριο συστατικό προσδιορίστηκε το D-λεμονένιο, σε ποσοστά που κυμαίνονται αντίστοιχα μεταξύ 83,91-90,75%, 72,35-89,63% και 80,06-97,79%. Από τα υπόλοιπα συστατικά, το μυρκένιο και το α-πινένιο ήταν αυτά που ανιχνεύτηκαν σε μικρότερα ποσοστά. Στην περίπτωση του λεμονιού (*C. limon*), το D-λεμονένιο αντιπροσώπευε μικρότερο ποσοστό της συνολικής σύστασης των αιθερίων ελαίων (37,22-56,50%), ακολουθούμενο από τα β-πινένιο, γ-τερπινένιο, μυρκένο και α-πινένιο.

Πίνακας 3.2.2. Κύρια συστατικά (>4%) των βιομηχανικής προέλευσης αιθερίων ελαίων των τεσσάρων ειδών *Citrus*.

| Συστατικά | C 01 | C 02 | C 03 | C 05 | C 06 | C 07 | C 09 | C 10 | C 11 | C 13 | C 14 | C 15 |
|-------------------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|
| <i>α</i> -πινένιο | 0,77 | 0,85 | | 2,29 | 5,08 | 2,09 | 0,79 | 1,74 | | 0,92 | 1,28 | 0,92 |
| <i>β</i> -πινένιο | | | | 10,51 | 19,16 | 13,68 | | | | | | |
| μυρκένιο | 2,64 | 2,92 | 1,78 | 2,01 | 3,71 | 1,91 | 2,66 | 4,28 | 2,15 | 3,10 | 3,61 | 4,05 |
| λεμονένιο | 72,35 | 89,63 | 79,56 | 37,22 | 52,66 | 56,50 | 80,06 | 92,75 | 97,79 | 83,91 | 95,01 | 90,75 |
| <i>γ</i> -τερπινένιο | | | | 10,42 | 13,86 | 13,39 | | | | | | |
| <i>β</i> -καρνοφυλλένιο | 0,85 | 0,89 | 4,26 | 0,62 | | 0,81 | | | | | | |
| Σύνολο | 76,61 | 94,29 | 85,6 | 63,07 | 94,47 | 88,38 | 83,51 | 98,77 | 99,94 | 87,93 | 99,9 | 95,72 |

Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με αντίστοιχη μελέτη για τη χημική σύσταση των αιθερίων ελαίων που προκύπτουν από τη βιομηχανική κρυο-συμπύεση των φλοιών πορτοκαλιού, μανταρινιού και λεμονιού, στην οποία προσδιορίστηκε ότι το λεμονένιο κυριαρχούσε στο σύνολο των ελαίων με συγκεντρώσεις που έφταναν το 85,5% για το πορτοκάλι, 74,38% για το μανταρίνι και 59,1% για το λεμόνι (Espina et al., 2011). Οι Ahmad et al. (2006) μελέτησαν τη χημική σύσταση των αιθερίων ελαίων που προέρχονται από την κρυο-συμπύεση των θρυμματισμένων φλοιών των εσπεριδοειδών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, το λεμονένιο έχει ανιχνευτεί σε ποσοστά 61,08% και 76,28 % στα αιθέρια έλαια που προέρχονται από δύο ποικιλίες γλυκού πορτοκαλιού, 86,27% σε αιθέριο έλαιο από γκρέιπφρουτ και 53,61% στο αιθέριο έλαιο του λεμονιού. Σε άλλη μελέτη, το αιθέριο έλαιο που παραλήφθηκε από την κρυο-συμπύεση καρπών του λεμονιού, έχει προσδιοριστεί να περιέχει ως κύριο συστατικό το λεμονένιο (75,68%), ακολουθούμενο από τα *β*-πινένιο (8,70%) και *γ*-τερπινένιο (7,19%) (Ferhat et al., 2007). Όσον αφορά το μανταρίνι, οι Sawamura et al. (2004) ανέλυσαν τα αιθέρια έλαια που παραλήφθηκαν από μια μέθοδο χειροκίνητης κρυο-συμπύεσης καρπών και φλοιών, και βρήκαν ότι περιέχουν μεγάλες ποσότητες λεμονενίου (80,3%). Γενικά, οι μελέτες που αφορούν τον προσδιορισμό της σύστασης των αιθερίων ελαίων των ειδών *Citrus* που προέρχονται από την κρυο-συμπύεση των καρπών τους είναι ελάχιστες, ενώ δεν έχουν έως τώρα μελετηθεί τα αιθέρια έλαια που προκύπτουν ως παραπροϊόντα της βιομηχανικής επεξεργασίας (κρυο-συμπύεσης) των καρπών κατά τη διαδικασία της χυμοποίησης. Επιπλέον, θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών αναφέρονται σε μη διορθωμένα ποσοστά των χημικών συστατικών, εξαιτίας της περιεκτικότητας των προϊόντων της κρυο-συμπύεσης (B.Π.Α.Ε) σε μη πτητικές ενώσεις, που δεν ανιχνεύονται από τα αναλυτικά όργανα.



Διάγραμμα 3.2.1. Αύξηση της περιεκτικότητας D-λεμονένιου στα εξευγενισμένα αιθέρια έλαια, εκφρασμένη ως το ποσοστό της αντίστοιχης περιεκτικότητας στο Β.Π.Α.Ε.

Η διαδικασία στην οποία υποβλήθηκαν τα υπό μελέτη Β.Π.Α.Ε., αφορούσε την ανάκτηση και περαιτέρω κλασματοποίηση των πτητικών τμημάτων των αρχικών Β.Π.Α.Ε., τα οποία αξιολογήθηκαν για πρώτη φορά παρουσιάζοντας ενδιαφέροντα αποτελέσματα ως προς την περιεκτικότητα των κύριων συστατικών τους. Η αρχική περιεκτικότητα των Β.Π.Α.Ε. διορθώθηκε βάσει του ποσοστού ανάκτησης του πτητικού κλάσματος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το ποσοστό του λεμονενίου αυξήθηκε, και στις τέσσερις περιπτώσεις, και στα δύο πτητικά κλάσματα της υδρο-απόσταξης, όπως φαίνεται στο **Διάγραμμα 3.2.1**. Στο γκρέιπφρουτ, το αρχικό ποσοστό του λεμονενίου στο Β.Π.Α.Ε. (72,35%) έφτασε το 89,63% στο 1^ο κλάσμα της υδρο-απόσταξης και το 79,56% στο 2^ο κλάσμα, ενώ άλλα συστατικά που παρουσίασαν αυξημένη συγκέντρωση στο 2^ο κλάσμα της υδρο-απόσταξης ήταν η α -τερπινεόλη (3,19%) και το β -καρνοφυλλένιο (4,26%). Η περιεκτικότητα του λεμονενίου στα πτητικά κλάσματα του λεμονιού εμφάνισε τη μεγαλύτερη αύξηση σε σχέση με το αρχικό Β.Π.Α.Ε. Συγκεκριμένα, το ποσοστό του λεμονενίου αυξήθηκε από το 37,22% στο Β.Π.Α.Ε. σε 52,66% στο 1^ο κλάσμα της υδρο-απόσταξης και σε 56,50% στο 2^ο κλάσμα, ενώ, παράλληλα, αυξημένα ποσοστά εμφάνισαν στο 1^ο κλάσμα τα συστατικά β -πινένιο (19,16%), α -πινένιο (5,08%) και γ -τερπινένιο (13,86%). Η κλασματοποίηση του Β.Π.Α.Ε. του μανταρινιού οδήγησε στην παραγωγή αιθερίων ελαίων με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση λεμονενίου. Συγκεκριμένα, το συστατικό αυτό ανιχνεύτηκε σε ποσοστά 92,75% και 97,79% στα κλάσματα 1 και 2 αντίστοιχα, σε σύγκριση με την αρχική του αφθονία στο Β.Π.Α.Ε. (80,06%). Άλλα συστατικά που ανιχνεύτηκαν σε αυξημένη αφθονία στο 1^ο κλάσμα της υδρο-απόσταξης του Β.Π.Α.Ε. μανταρινιού ήταν: μυρκένιο (4,28%), α -πινένιο (1,74%) και σαμπινένιο (1,18%). Όσον αφορά

το πορτοκάλι, το ποσοστό του λεμονενίου αυξήθηκε στο 1^ο κλάσμα της υδρο-απόσταξης φτάνοντας το 95,01% από 83,91% στο αρχικό Β.Π.Α.Ε. Στο 2^ο κλάσμα της υδρο-απόσταξης παρατηρήθηκαν αυξημένα τα ποσοστά των συστατικών: λεμονένιο (90,75%), μυρκένιο (4,05%) και α -τερπινολένιο (1,07%). Συμπερασματικά, στο πλαίσιο αξιοποίησης των χαμηλής αξίας παρα-προϊόντων της βιομηχανικής επεξεργασίας/χυμοποίησης των καρπών *Citrus*, η διαδικασία εξευγενισμού που εφαρμόστηκε μπορεί να αποτελέσει τη βάση ανάπτυξης ενός πρωτοκόλλου για την παραλαβή λεμονενίου αναλυτικής καθαρότητας έως 97%. Προς την κατεύθυνση αυτή, το δεύτερο κλάσμα του μανταρινιού αποτελεί την καλύτερη εναλλακτική πηγή ανάκτησης του πολύτιμου αυτού συστατικού.

3.2.1.2. Αιθέρια έλαια των καρπών

Οι αποδόσεις των αιθερίων ελαίων, όπως προέκυψαν από την απ' ευθείας κλασική υδρο-απόσταξη των καρπών έξι ειδών *Citrus*, παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.2.3**. Οι αποδόσεις διακυμάνθηκαν μεταξύ 0,38 mL/kg και 1,16 mL/kg, με το νεράντζι να εμφανίζει τη μικρότερη και το λεμόνι τη μεγαλύτερη απόδοση, αντίστοιχα.

Πίνακας 3.2.3. Αποδόσεις αιθερίων ελαίων προερχόμενων από την υδρο-απόσταξη των καρπών 6 ειδών *Citrus*.

| Κωδικός | Είδος | Κοινή ονομασία | Απόδοση ΑΕ (mL/kg) |
|---------|--------------------------|----------------|--------------------|
| C 04 | <i>Citrus x paradisi</i> | γκρέιπφρουτ | 0,56 |
| C 08 | <i>Citrus limon</i> | λεμόνι | 1,16 |
| C 12 | <i>Citrus reticulata</i> | μανταρίνι | 0,56 |
| C 16 | <i>Citrus sinensis</i> | πορτοκάλι | 0,59 |
| C 17 | <i>Citrus japonica</i> | κουμκουάτ | 0,87 |
| C 18 | <i>Citrus aurantium</i> | νεράντζι | 0,38 |

Στον **Πίνακα 3.2.4** παρουσιάζονται τα κύρια συστατικά (>4%) των αιθερίων ελαίων των έξι καρπών *Citrus* όπως προέκυψαν από τη φυτοχημική ανάλυση με χρήση Αέριας Χρωματογραφίας συνδυασμένης με Φασματομετρία Μαζών (GC-MS). Τα αναλυτικά αποτελέσματα της ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης των αιθερίων ελαίων παρατίθενται στο **Παράρτημα**. Συνολικά, ανιχνεύτηκαν 64 φυτοχημικά συστατικά που αντιπροσωπεύουν από το 94,89% έως το 99,08% του συνολικού φυτοχημικού περιεχομένου των αιθερίων ελαίων. Το λεμονένιο αποτέλεσε και πάλι το κυρίαρχο συστατικό για το σύνολο των αιθερίων ελαίων, παρουσιάζοντας τη μέγιστη περιεκτικότητα σε μανταρίνι (89,34%), πορτοκάλι (89,26%) και τη μικρότερη στο λεμόνι (29,64%). Το α -τερπινολένιο ανιχνεύτηκε σε σημαντικό ποσοστό

(5,72%) στο αιθέριο έλαιο του πορτοκαλιού, ενώ τα μόρια β -πινένιο (13,35%), γ -τερπινένιο (13,09%) και α -τερπινεόλη (10,23%) ανιχνεύτηκαν σε μεγάλα ποσοστά στο αιθέριο έλαιο του λεμονιού. Το μυρκένιο ανιχνεύθηκε σε παρόμοια ποσοστά στα αιθέρια έλαια των υπό μελέτη ειδών (1,17-2,99%). Σε σημαντικά ποσοστά ανιχνεύθηκαν, επίσης, τα φυτοχημικά συστατικά: *trans*-οξείδιο της λιναλοόλης (3,25%) και νουτκατόνη (2,35%) στο αιθέριο έλαιο του γκρέιπφρουτ.

Πίνακας 3.2.4. Κύρια συστατικά (>4%) των αιθερίων ελαίων των καρπών έξι ειδών *Citrus*.

| Συστατικά | C 04 | C 08 | C 12 | C 16 | C 17 | C 18 |
|------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| β -πινένιο | | 13,35 | | | | 0,66 |
| λεμονένιο | 77,70 | 29,64 | 89,34 | 82,92 | 89,26 | 82,64 |
| γ -τερπινένιο | 0,34 | 13,09 | | | | 0,12 |
| α -τερπινολένιο | 1,31 | 1,33 | 1,43 | 5,72 | 0,18 | 2,82 |
| α -τερπινεόλη | 1,31 | 10,23 | 0,64 | 1,14 | 2,12 | 3,13 |
| Σύνολο | 80,66 | 67,64 | 91,41 | 89,78 | 91,56 | 89,37 |

Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με αντίστοιχα προηγούμενων μελετών, όσον αφορά την κυριαρχία του λεμονενίου στα αιθέρια έλαια που έχουν παραληφθεί με υδρο-απόσταξη από καρπούς πορτοκαλιού, γκρέιπφρουτ, νεραντζιού, μανταρινιού και λεμονιού. Στις μελέτες αυτές, η περιεκτικότητα του λεμονενίου κυμαίνεται μεταξύ 91,14-96,2% για τα αιθέρια έλαια του πορτοκαλιού, 88,6-97,6% για το γκρέιπφρουτ, 94,27-96,7 % το νεράντζι, 46,7-92,4% το μανταρίνι και 59,3-74,3% το λεμόνι (Caccioni et al., 1998; Ferhat et al., 2007; Chutia et al., 2009; Michaelakis et al., 2009; Uysal et al., 2011; Giatropoulos et al., 2012; Sultana et al., 2012). Γενικώς, τα αιθέρια έλαια των καρπών πορτοκαλιού, γκρέιπφρουτ και νεραντζιού παρουσιάζουν παρόμοιο φυτοχημικό προφίλ που χαρακτηρίζεται από υψηλές συγκεντρώσεις λεμονενίου, ενώ τα δευτερεύοντα συστατικά απαντώνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, που συνήθως δεν υπερβαίνουν το 1% (Caccioni et al., 1998; Michaelakis et al., 2009; Uysal et al., 2011; Giatropoulos et al., 2012). Το *trans*-οξείδιο της λιναλοόλης και η νουτκατόνη, που ανιχνεύτηκαν σε υψηλά ποσοστά στα υπό μελέτη αιθέρια έλαια του γκρέιπφρουτ, παλαιότερα έχουν ανιχνευθεί μόνο σε ίχνη (<0,3%) σε αντίστοιχα δείγματα (Caccioni et al., 1998). Η μελέτη των αιθερίων ελαίων του μανταρινιού παρουσιάζει διαφοροποιημένα αποτελέσματα ως προς τη χημική τους σύσταση. Σε παλαιότερες μελέτες της χημικής σύστασης των αιθερίων ελαίων μανταρινιού που έχουν παραληφθεί με τη μέθοδο της υδρο-απόσταξης, η συγκέντρωση του λεμονενίου έχει αναφερθεί να κυμαίνεται από υψηλά (92,4%) (Sultana et al., 2012) έως χαμηλά ποσοστά (46,7 %) (Chutia et al., 2009). Στην πρώτη μελέτη, μετά το λεμονένιο ως κυριότερα συστατικά αναφέρονται τα γ -τερπινένιο (2,6 %) και

β -φελλανδρένιο (1,8%) (Sultana et al., 2012), ενώ στη δεύτερη τα συστατικά γερανιάλη (19,0%), νεράλη (14,5%), γερανυλ-οξείδιο (3,9%), γερανιόλη (3,5%), β -καρυοφυλλένιο (2,6%), νερόλη (2,3%), σιτρονελάλη (1,3%) και νερυλ-οξείδιο (1,1%) (Sultana et al., 2012).

Όσον αφορά τα αιθέρια έλαια του λεμονιού, συνήθως αυτά περιέχουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις λεμονενίου, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα είδη. Παράλληλα, ανιχνεύονται ικανές συγκεντρώσεις των συστατικών β -πινένιο, γ -τερπινένιο, μυρκένιο, α -πινένιο, γερανιάλη και νεράλη (Chutia et al., 2009; Ferhat et al., 2007; Michaelakis et al., 2009; Giatropoulos et al., 2012). Θα πρέπει όμως να επισημανθεί ότι στην παρούσα μελέτη για πρώτη φορά αναφέρεται η παρουσία των αλκοολών α -τερπινεόλη και 4-τερπινεόλη σε τόσο υψηλά ποσοστά (10,23% και 3,30%, αντίστοιχα). Τέλος, τα αιθέρια έλαια του κουμκουάτ (*Citrus japonica*) έχουν μελετηθεί ως προς το φυτοχημικό τους περιεχόμενο παρουσιάζοντας υψηλά ποσοστά λεμονενίου (51,0-73,7%) και σημαντικές συγκεντρώσεις ποικίλων δευτερευόντων συστατικών όπως το γερμακρένιο-D, το μυρκένιο και το β -φελλανδρένιο (Quijano and Pino, 2009; Nouri and Shafaghatlonbar, 2015). Στο αιθέριο έλαιο του κουμκουάτ που μελετήθηκε στη διατριβή δεν ανιχνεύτηκε β -φελλανδρένιο και το συστατικό γερμακρένιο-D ανιχνεύτηκε σε ίχνη (<0,5%). Όμως, σημαντική ήταν η παρουσία του μυρκένιου (2,99%) και της α -τερπινεόλης (2,12%).

3.2.2. Βιοδραστικότητα

Τα αιθέρια έλαια που προήλθαν από τα τέσσερα Β.Π.Α.Ε., αλλά και απ' ευθείας από την υδρο-απόσταξη των καρπών έξι ειδών *Citrus* αξιολογήθηκαν -στη συνέχεια- ως προς την προνυμφοκτόνο και απωθητική τους δράση έναντι του είδους *Aedes albopictus*. Συνολικά, από τα δείγματα που μελετήθηκαν, τρία αιθέρια έλαια αξιολογήθηκαν ως αποτελεσματικά προνυμφοκτόνα και πέντε ως ισχυρά απωθητικά. Τα αιθέρια έλαια που προέκυψαν απ' ευθείας από τους καρπούς του πορτοκαλιού (*C. sinensis*) (C16) και κουμ-κουάτ (*C. japonica*) (C17) απεδείχθη ότι διαθέτουν ταυτόχρονα ισχυρή προνυμφοκτόνο και απωθητική δράση. Τα αναλυτικά αποτελέσματα των βιοδοκιμών προνυμφοκτονίας και απωθητικότητας των υπό μελέτη αιθερίων ελαίων των ειδών *Citrus* συζητούνται στα επόμενα υποκεφάλαια.

3.2.2.1. Προνυμφοκτόνος δράση

Τα αποτελέσματα της προνυμφοκτόνου δράσης τόσο των Β.Π.Α.Ε., όσο και των αιθερίων ελαίων που προέρχονται από την απ' ευθείας υδρο-απόσταξη των καρπών *Citrus*

έναντι του είδους *Aedes albopictus* παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.2.5**. Επειδή τα αιθέρια έλαια της υδρο-απόσταξης των καρπών πορτοκαλιού και γκρέιπφρουτ είχαν παρόμοια ποιοτική και ποσοτική χημική σύσταση, δεν προσδιορίστηκε η προνουμοκτόνος δράση του δεύτερου (C04). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως τα μέσα ποσοστά των νεκρών προνουμών 24 ώρες μετά την εφαρμογή των υπό μελέτη αιθερίων ελαίων. Η δράση των αιθερίων ελαίων ταξινομήθηκε σε «χαμηλή», «μέτρια» και «ισχυρή», ανάλογα με τα μέσα ποσοστά θνησιμότητας προνουμών που προκαλούν και κυμαίνονται αντίστοιχα μεταξύ 0–50%, 50–80% και 80–100%.

Πίνακας 3.2.5. Τοξική δράση των αιθερίων ελαίων *Citrus* εναντίον των προνουμών 3^{ης} - 4^{ης} ηλικίας *Aedes albopictus* εκφρασμένη ως μέσο ποσοστό νεκρών προνουμών (\pm Τυπικό Σφάλμα Μέτρησης, Τ.Σ.Μ.) 24 ώρες μετά την εφαρμογή.

| Κωδικός | Μέσο ποσοστό (\pm Τ.Σ.Μ.) νεκρών προνουμών | Ταξινόμηση |
|---------|---|------------|
| C01 | 2,00 \pm 1,22 | χαμηλή |
| C02 | 28,00 \pm 6,04 | χαμηλή |
| C03 | 24 \pm 6 | χαμηλή |
| C05 | 23,00 \pm 8,75 | χαμηλή |
| C06 | 74 \pm 6 | μέτρια |
| C07 | 31,00 \pm 2,92 | χαμηλή |
| C08 | 26 \pm 4 | χαμηλή |
| C09 | 2,00 \pm 1,22 | χαμηλή |
| C10 | 14,0 \pm 4,3 | χαμηλή |
| C11 | 0 \pm 0 | χαμηλή |
| C12 | 46,00 \pm 8,12 | χαμηλή |
| C13 | 10,0 \pm 8,8 | χαμηλή |
| C14 | 51,0 \pm 6,2 | μέτρια |
| C15 | 94,00 \pm 3,67 | ισχυρή |
| C16 | 84,00 \pm 6,78 | ισχυρή |
| C17 | 88,0 \pm 4,9 | ισχυρή |
| C18 | 54,00 \pm 6,78 | μέτρια |
| DMSO | 0 \pm 0 | |

DMSO: dimethyl sulfoxide (μάρτυρας)

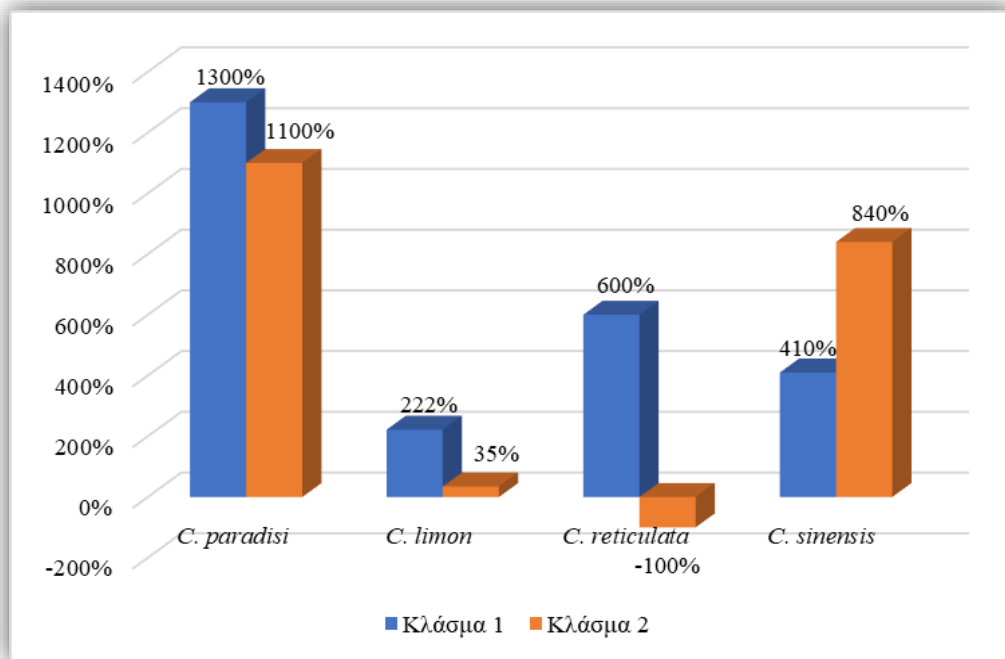
Δ.Π.: Δεν Προσδιορίστηκαν

Την ισχυρότερη προνουμοκτόνο δράση παρουσίασαν τα αιθέρια έλαια που προέρχονται από το 2^ο κλάσμα της υδρο-απόσταξης του ΒΠΑΕ του πορτοκαλιού (C15) και την απ' ευθείας υδρο-απόσταξη των καρπών πορτοκαλιού (C16) και κουμκουάτ (C17). Μέτρια δράση εμφάνισαν τα πρώτα πτητικά κλάσματα των Β.Π.Α.Ε. λεμονιού (C06) και πορτοκαλιού (C14), καθώς και το αιθέριο έλαιο του νερατζιού (C18). Αντίθετα, τα Β.Π.Α.Ε. των γκρέιπφρουτ (C01) και μανταρινιού (C09), καθώς και το δεύτερο πτητικό κλάσμα του Β.Π.Α.Ε. του μανταρινιού

(C11) δεν εμφάνισαν τοξικότητα.

Ανάμεσα στα αιθέρια έλαια που παραλήφθηκαν απ' ευθείας από τους καρπούς των ειδών *Citrus* με κλασική υδρο-απόσταξη, το προερχόμενο από το κουμκουάτ παρουσίασε την ισχυρότερη δράση, προκαλώντας 88 % θνησιμότητα προνυμφών, ακολουθούμενο από το πορτοκάλι (84 % θνησιμότητα) και το μανταρίνι (46% θνησιμότητα). Ασθενέστερη ήταν η δράση του αιθερίου ελαίου του λεμονιού (26% θνησιμότητα). Θα πρέπει να τονιστεί ότι η αξιολόγηση του αιθερίου ελαίου του κουμκουάτ ως προς την προνυμφοκτόνο δράση του έναντι των κουνουπιών έγινε για πρώτη φορά στο πλαίσιο της διατριβής αυτής και τα σχετικά αποτελέσματα είναι εντυπωσιακά. Όσον αφορά τα υπόλοιπα είδη, τα αποτελέσματα που εξήχθησαν διαφέρουν από τα αποτελέσματα αντίστοιχων πειραματισμών της βιβλιογραφίας. Αναλυτικότερα, μελέτη για την τοξική δράση των αιθερίων ελαίων ειδών *Citrus* έναντι προνυμφών του *Aedes albopictus*, είχε αναδείξει ως πλέον δραστικό το αιθέριο έλαιο του λεμονιού με τοξικότητα LC₅₀: 25,03 mg/L και LC₉₀: στα 34,65 mg/L, ακολουθούμενο από το πορτοκάλι (LC₅₀: 28,68 mg/L και LC₉₀: 45,73 mg/L) και τέλος το γκρέιπφρουτ (LC₅₀: 37,03 mg/L και LC₉₀: 49,14 mg/L) (Michaelakis et al., 2009; Akram et al., 2010; Din et al., 2011; Giatropoulos et al., 2012).

Όσον αφορά τα Β.Π.Α.Ε. που παραλήφθηκαν με τη μέθοδο της κρυο-συμπίεσης των αντίστοιχων καρπών κατά τη διάρκεια της χυμοποίησης, αυτά εμφάνισαν μηδαμινή έως μέτρια τοξικότητα έναντι των προνυμφών του *Aedes albopictus*. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με την υποτιμημένη αξία των υποπροϊόντων αυτών. Ωστόσο, η διαδικασία εξευγενισμού που εφαρμόστηκε στα παραπάνω Β.Π.Α.Ε. οδήγησε στην ενίσχυση της προνυμφοκτόνου δράσης τους για εφτά από τα οκτώ πτητικά κλάσματα που μελετήθηκαν, σύμφωνα με το **Διάγραμμα 3.2.2**. Η διαφορά αυτή είναι εμφανέστερη στα δύο πτητικά κλάσματα του Β.Π.Α.Ε. από το γκρέιπφρουτ, στα οποία η προνυμφοκτόνος δράση αυξήθηκε κατά 1100% στο 1^ο και 1300% στο 2^ο κλάσμα. Την ισχυρότερη δράση παρουσίασαν το 1^ο πτητικό κλάσμα του λεμονιού (C06) και το 2^ο πτητικό κλάσμα του πορτοκαλιού (C15), που προκάλεσαν 74% και 94% θνησιμότητα προνυμφών, αντίστοιχα. Από τα οκτώ πτητικά κλάσματα που παραλήφθηκαν από την υδρο-απόσταξη των Β.Π.Α.Ε., μόνο το 2^ο κλάσμα του μανταρινιού (C11) δεν παρουσίασε τοξική δράση έναντι των προνυμφών *Aedes albopictus*. Επομένως, η διαδικασία εξευγενισμού που εφαρμόστηκε στα Β.Π.Α.Ε των τεσσάρων ειδών *Citrus*, οδήγησε στην αξιοσημείωτη ενίσχυση της προνυμφοκτόνου δράσης τους έναντι των κουνουπιών, αυξάνοντας έτσι και την αξία τους ως βιομηχανικά παραπροϊόντα.



Διάγραμμα 3.2.2. Μεταβολή της προνυμφοκτόνου δράσης των εξευγενισμένων αιθερίων ελαίων, εκφρασμένη ως ποσοστό της δράσης των αντίστοιχων Β.Π.Α.Ε.

Θα πρέπει επίσης να επισημανθεί ότι σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ της προνυμφοκτόνου δράσης των αιθερίων ελαίων και του περιεχομένου των κύριων συστατικών τους. Βέβαια, ο ρόλος του D-λεμονενίου ως προνυμφοκτόνου συστατικού των αιθερίων ελαίων ειδών *Citrus* έναντι των κουνουπιών έχει ήδη συζητηθεί σε αρκετές μελέτες (Kassir et al., 1989; Chantraine et al., 1998; Michaelakis et al., 2008; Santos et al., 2011; Giatropoulos et al., 2012; Regnault-Roger et al., 2012). Η έλλειψη, ωστόσο, προνυμφοκτόνου δράσης στο 2^ο κλάσμα της υδρο-απόσταξης του Β.Π.Α.Ε. του μανταρινιού (C11), παρ' ότι εμφάνισε τη μέγιστη περιεκτικότητα σε D-λεμονένιο (97,8%), οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η προνυμφοκτόνος δράση πιθανά να οφείλεται στη συνδυαστική δράση του λεμονενίου με κάποιο εκ των δευτερευόντων συστατικών των αιθερίων ελαίων. Οι Giatropoulos et al. (2012) μελέτησαν την προνυμφοκτόνο δράση τριών αιθερίων ελαίων *Citrus* σε σχέση με την κατανομή των εναντιομερών των συστατικών τους και διαπίστωσαν ότι τα αιθέρια έλαια εμφάνισαν χαμηλότερες τιμές LC₅₀ και LC₉₀ από ότι τα περισσότερα μεμονωμένα συστατικά που μελετήθηκαν. Επιπλέον, στην ίδια μελέτη, το γ-τερπινένιο παρουσίασε τη μεγαλύτερη τοξικότητα (LC₅₀ στα 20,21 mg/L και LC₉₀ στα 32,31 mg/L) σε προνύμφες του *Aedes albopictus* ανάμεσα στα συστατικά που μελετήθηκαν. Τα υπό μελέτη αιθέρια έλαια του λεμονιού, ωστόσο, παρά την υψηλή τους περιεκτικότητα σε γ-τερπινένιο (10,42 - 13,86%), παρουσίασαν μέτρια έως καλή προνυμφοκτόνο δράση, ενώ στα αιθέρια έλαια με ισχυρή προνυμφοκτόνο δράση (C15, C16 και C17) απουσίαζε το συστατικό αυτό. Άλλα φυτοχημικά

συστατικά που περιέχονται στα αιθέρια έλαια των ειδών *Citrus* και έχουν εμφανίσει προνυμφοκτόνο δράση έναντι των κουνουπιών είναι τα α -πινένιο, β -πινένιο, κιτράλη, μυρκένιο, 3-καρένιο και τερπινεν-4-όλη (Cheng et al., 2009; Perumalsamy et al., 2009; Pohlit et al., 2011; Giatropoulos et al., 2012; Vourlioti-Arapi et al., 2012). Έτσι, σύμφωνα με τα συνδυαστικά αποτελέσματα της χημικής σύστασης και προνυμφοκτόνου δράσης των αιθερίων ελαίων *Citrus* που μελετήθηκαν, συνάγεται το συμπέρασμα ότι η βιοδραστικότητά τους επηρεάζεται από το συνολικό φυτοχημικό τους περιεχόμενο και όχι από τη μεμονωμένη δράση ενός συστατικού. Η σημασία της συνέργειας μεταξύ των συστατικών των αιθερίων ελαίων στην ενίσχυση της βιοδραστικότητάς τους έχει τονιστεί στο παρελθόν και από άλλους μελετητές (Miresmailli et al., 2006; Jiang et al., 2009; Campolo et al., 2015; Tak et al., 2015).

3.2.2.2. Αποθητικά

Στον Πίνακα 3.2.6 συνοψίζονται τα αποτελέσματα της αποθητικής δράσης τόσο των βιομηχανικής προέλευσης αιθερίων ελαίων (Β.Π.Α.Ε.), όσο και των αιθερίων ελαίων που προέρχονται απ' ευθείας από την υδρο-απόσταξη των καρπών *Citrus* έναντι του είδους *Aedes albopictus*. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος αριθμός προσγειώσεων των τελείων κουνουπιών *Aedes albopictus* στο ακάλυπτο τμήμα ενός εμποτισμένου με αιθέριο έλαιο γαντιού, μετά από 5 λεπτά έκθεσης. Συνολικά, τα πέντε από τα 18 αιθέρια έλαια που μελετήθηκαν εμφάνισαν δράση όμοια με αυτήν του DEET (N,N-Diethyl-meta-toluamide), του πλέον δραστικού συνθετικού αποθητικού των κουνουπιών. Συγκεκριμένα, τα αιθέρια έλαια που προέρχονταν από την απ' ευθείας υδρο-απόσταξη των καρπών των γκρέιπφρουτ (C04), λεμονιού (C08), πορτοκαλιού (C16), κουμκουάτ (C17) και νεραντζιού (C18) εμφάνισαν τις ισχυρότερες δράσεις.

Παρά την ευρεία χρήση των αιθερίων ελαίων των ειδών *Citrus*, οι γνώσεις περί της αποθητικής τους δράσης για τα κουνούπια είναι μάλλον περιορισμένες. Συγκεκριμένα, τα αιθέρια έλαια του πορτοκαλιού έχουν μελετηθεί ως προς την αποθητική τους δράση έναντι των ειδών *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi* και *Anopheles dirus* (Oshaghi et al. 2003; Siriporn and Mayura, 2010; Phasomkusolsil and Soonwera, 2011; Giatropoulos et al. 2012; Soonwera, 2015) με ποικίλα και σαφώς διαφοροποιημένα αποτελέσματα. Αντίστοιχα, εναντίον των τελείων των *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* και *Aedes albopictus* έχουν παρουσιάσει ισχυρή αποθητική δράση τα αιθέρια έλαια του λεμονιού (Oshaghi et al. 2003; Phasomkusolsil and Soonwera 2010; Kazembe and Chaibva, 2012; Giatropoulos et al. 2012). Σε μελέτες που συνέκριναν την αποθητική δράση

των δύο παραπάνω ειδών, τα αιθέρια έλαια του λεμονιού έχουν εμφανίσει ισχυρότερη δράση σε σύγκριση με τα αντίστοιχα του πορτοκαλιού (Phasomkusolsil and Soonwera 2010; Oshaghi et al. 2003; Giatropoulos et al., 2012). Ο Soonwera (2015) μελέτησε την απωθητική δράση, σε σχέση με το χρόνο και το ποσοστό προστασίας, των αιθερίων ελαίων που προέρχονται από διαφορετικά είδη *Citrus* έναντι των ειδών *Aedes aegypti* και *Culex quinquefasciatus*, συμπεριλαμβανομένων των αιθερίων ελαίων πορτοκαλιού, μανταρινιού και νεραντζιού. Ανάμεσα στα τρία αυτά είδη, το μανταρίνι εμφάνισε την ισχυρότερη δράση, ακολουθούμενο από το πορτοκάλι και, τέλος το νεράντζι, ενώ όλα παρουσίασαν σημαντικά μεγαλύτερο χρόνο προστασίας από το συνθετικό απωθητικό IR3535. Αξίζει να αναφερθεί ότι η απωθητική για τα κουνούπια δράση του αιθερίου ελαίου του κουμκουάτ μελετάται για πρώτη φορά στην παρούσα διατριβή, παρουσιάζοντας εντυπωσιακά αποτελέσματα.

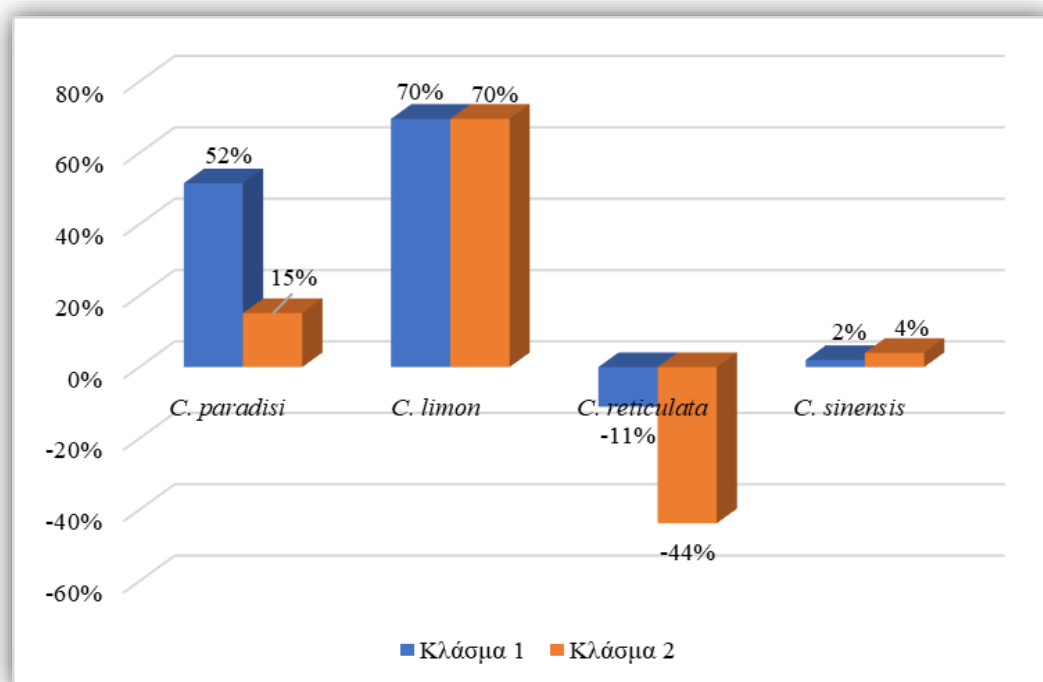
Πίνακας 3.2.6. Απωθητική δράση των αιθερίων ελαίων *Citrus* εναντίον τελείων του *Aedes albopictus* εκφρασμένη ως μέσος αριθμός προσγειώσεων (\pm Τυπικό Σφάλμα Μέτρησης, Τ.Σ.Μ.) μετά από 5 λεπτά έκθεσης.

| Κωδικός | Μέσος αριθμός (\pm Τ.Σ.Μ.) προσγειώσεων / 5 λεπτά | P_{DEET} | P_{DCM} |
|---------|---|------------|-----------|
| C01 | 32,88 \pm 3,85 | 0,0003* | 0,0011* |
| C02 | 50,63 \pm 3,62 | 0,0003* | 0,1712 |
| C03 | 38,00 \pm 1,04 | 0,0003* | 0,0008* |
| C04 | 0,25 \pm 0,25 | 0,3173 | 0,0005* |
| C05 | 23,00 \pm 5,32 | 0,0003* | 0,0011* |
| C06 | 39,00 \pm 5,19 | 0,0003* | 0,0117* |
| C07 | 39,50 \pm 7,71 | 0,0003* | 0,1275 |
| C08 | 0 \pm 0 | 1 | 0,0003* |
| C09 | 36,00 \pm 2,71 | 0,0003* | 0,0008* |
| C10 | 32,63 \pm 0,86 | 0,0003* | 0,0008* |
| C11 | 18,00 \pm 3,04 | 0,0003* | 0,0008* |
| C12 | 3,88 \pm 0,83 | 0,0003* | 0,0008* |
| C13 | 49,63 \pm 1,89 | 0,0003* | 0,0237* |
| C14 | 51,00 \pm 4,25 | 0,0003* | 0,1412 |
| C15 | 52,13 \pm 5,10 | 0,0003* | 0,1267 |
| C16 | 0 \pm 0 | 1 | 0,0003* |
| C17 | 0,25 \pm 0,25 | 0,3173 | 0,0005* |
| C18 | 0 \pm 0 | 1 | 0,0003* |
| DEET | 0 \pm 0 | - | - |
| DCM | 56 \pm 4 | - | - |

DEET: N,N-Diethyl-meta-toluamide (θετικός μάρτυρας)

DCM: dichloromethane (μάρτυρας)

* Σημαντική Διαφορά ($d.f. = 1, \alpha = 0.05$)



Διάγραμμα 3.2.3. Μεταβολή της απωθητικής δράσης των εξευγενισμένων αιθερίων ελαίων, εκφρασμένη ως ποσοστό της δράσης (αριθμός προσγειώσεων τελείων του *Aedes albopictus*) των αντίστοιχων Β.Π.Α.Ε.

Όσον αφορά τα βιομηχανικής προέλευσης αιθέρια έλαια (Β.Π.Α.Ε.), αυτά εμφάνισαν χαμηλή έως μέτρια απωθητική δράση έναντι των τελείων *Aedes albopictus*, ενώ ο εξευγενισμός τους δεν απέφερε σημαντικά αποτελέσματα σε σχέση με την απωθητική τους δράση. Συγκεκριμένα, τα πτητικά κλάσματα του πορτοκαλιού (C11, C12) εμφάνισαν απωθητική δράση παρόμοια με το αντίστοιχο Β.Π.Α.Ε. (C10), με μέσο αριθμό προσγειώσεων 50. Η κλασματοποίηση των Β.Π.Α.Ε. από γκρέιπφρουτ (C02, C03) και λεμόνι (C05, C06) οδήγησε σε σημαντική αύξηση του αριθμού προσγειώσεων σε σύγκριση με τα αντίστοιχα Β.Π.Α.Ε. (C01 και C04 αντίστοιχα) και, επομένως, σε σημαντική μείωση της απωθητικής τους δράσης. Όσον αφορά τα πτητικά κλάσματα του μανταρινιού, αυτά εμφάνισαν διαφοροποιημένα αποτελέσματα, καθώς τόσο το πρώτο (C10), όσο και το δεύτερο κλάσμα (C11) εμφάνισαν ισχυρότερη απωθητική δράση από το αντίστοιχο Β.Π.Α.Ε. (C09), προκαλώντας λιγότερες προσγειώσεις κατά 11% και 44%, αντίστοιχα. Η μεταβολή της απωθητικής δράσης στα πτητικά κλάσματα των Β.Π.Α.Ε., όπως περιγράφεται παραπάνω, παρουσιάζεται στο **Διάγραμμα 3.2.3.**

Η απωθητική δράση των αιθερίων ελαίων ειδών *Citrus* έχει συνδεθεί με την περιεκτικότητά τους περισσότερο σε αλδεΰδες (π.χ. κιτράλη), οξειδία (π.χ. οξειδίο του

λεμονενίου) και αλκοόλες (π.χ. 4-τερπινεόλη), παρά σε υδρογονάνθρακες (π.χ. λεμονένιο, α - ή β -πινένιο) (Hao et al., 2008; Weldon et al., 2011; Giatropoulos et al., 2012). Τα αιθέρια έλαια των καρπών *Citrus* που παρουσίασαν την ισχυρότερη απωθητική δράση, είχαν γενικά υψηλότερη περιεκτικότητα σε οξυγονωμένα συστατικά, με κυριότερα τις αλκοόλες 4-τερπινεόλη και α -τερπινεόλη. Επιπλέον, καθώς η απωθητική δράση των υπό μελέτη αιθερίων ελαίων και η διακύμανση των κύριων συστατικών τους δεν εμφάνισαν σημαντική συσχέτιση, πιθανολογείται ότι τα συστατικά που απαντώνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε αυτά τα αιθέρια έλαια παίζουν σημαντικό ρόλο στη δράση τους αυτή. Η συμβολή αυτή των δευτερευόντων συστατικών των αιθερίων ελαίων στην απωθητική τους δράση έχει τονιστεί σε προηγούμενες μελέτες (Hummelbrunner and Isman, 2001; Omolo et al., 2004; Gillij et al., 2008). Τέλος, η μείωση της απωθητικής δράσης στα πτητικά κλάσματα των περισσότερων Β.Π.Α.Ε., θα μπορούσε ενδεχομένως να οφείλεται και την έλλειψη των φυτοχημικών που περιέχονται στα μη πτητικά (χρωματιστά) κλάσματα των Β.Π.Α.Ε. Τα αιθέρια έλαια που προκύπτουν με τη μέθοδο της κρυο-συμπίεσης των καρπών *Citrus*, περιέχουν υψηλά ποσοστά μη πτητικών τμημάτων που περιλαμβάνουν υδρογονάνθρακες, στερόλες, λιπαρά οξέα, καροτενοειδή, κουμαρίνες ψωραλένια, και φλαβονοειδή (Dugo and Mondello, 2010).

3.3. Φυσικά βιοκτόνα από τη διατροφική βιοποικιλότητα

3.3.1. Χημική σύσταση

Στον Πίνακα 3.3.1 παρουσιάζονται οι αποδόσεις των 16 αιθερίων ελαίων που προέκυψαν από την υδρο-απόσταξη των διαφορετικών αρωματικών-αρτυματικών *taxa* που επιλέχθηκαν προς μελέτη. Εξαιτίας των χαμηλών τους αποδόσεων, τα αιθέρια έλαια V02, V03, V04, V07, V08, V11 και V13 αποκλείστηκαν από την περαιτέρω μελέτη της χημικής τους σύστασης και της βιοδραστικότητας. Τα υπόλοιπα εννέα έλαια, που προέρχονται από τις οικογένειες των *Apiaceae*, *Lamiaceae* και *Rutaceae* εμφάνισαν ικανοποιητικές έως υψηλές αποδόσεις με το αιθέριο έλαιο της λυγαριάς (*Vitex agnus-castus* L.) να εμφανίζει τη χαμηλότερη (2,05 ml/kg) και του *Satureja thymbra* L. (θρούμπι) την υψηλότερη (13,11 ml/kg).

Πίνακας 3.3.1. Αποδόσεις αιθερίων ελαίων των 15 αρωματικών-αρτυματικών *taxa*.

| Κωδικός | Είδος | Οικογένεια | Βάρος απόσταξης (g) | Απόδοση αιθέριου ελαίου (ml/kg) |
|---------|--|------------|---------------------|---------------------------------|
| V 01 | <i>Ruta chalepensis</i> L. | Rutaceae | 595 | 4,71 |
| V 02 | <i>Mandragora officinarum</i> | Solanaceae | 678 | 0,29 |
| V 03 | <i>Athamanta densa</i> Boiss. and Orph. | Apiaceae | 243 | 0,41 |
| V 04 | <i>Athamanta densa</i> Boiss. and Orph. | Apiaceae | 196 | 1,53 |
| V 05 | <i>Echinophora tenuifolia</i> ssp. <i>sibthorpiana</i> (Guss.) Tutin | Apiaceae | 352 | 3,13 |
| V 06* | <i>Echinophora tenuifolia</i> ssp. <i>sibthorpiana</i> (Guss.) Tutin | Apiaceae | 368 | 5,71 |
| V 07 | <i>Smyrniium</i> sp. | Apiaceae | 189 | 0,53 |
| V 08 | <i>Smyrniium</i> sp. | Apiaceae | 159 | 0,63 |
| V 09 | <i>Salvia fruticosa</i> Mill. | Lamiaceae | 516 | 4,46 |
| V 10 | <i>Thymbra capitata</i> (L.) Cav. | Lamiaceae | 75 | 5,33 |
| V 11 | <i>Satureja juliana</i> L. | Lamiaceae | 293 | 0,34 |
| V 12 | <i>Origanum onites</i> L. | Lamiaceae | 119 | 6,72 |
| V 13 | <i>Anthemis chia</i> L. | Asteraceae | 255 | 0,39 |
| V 14 | <i>Foeniculum vulgare</i> Mill. | Apiaceae | 692 | 5,35 |
| V 15 | <i>Vitex agnus-castus</i> L. | Lamiaceae | 391 | 2,05 |
| V 16 | <i>Satureja thymbra</i> L. | Lamiaceae | 206 | 13,11 |

* υποβλήθηκε σε όξινη υδρο-απόσταξη

Λόγω χαμηλής απόδοσης αποκλείστηκαν από την περαιτέρω μελέτη

Με βάση τα αποτελέσματα της φυτοχημικής ανάλυσης των αιθερίων ελαίων των υπό μελέτη *taxa* με τη χρήση Αέριας Χρωματογραφίας συνδυασμένης με Φασματομετρία Μαζών (GC-MS), ανιχνεύτηκε ποσοτικά η παρουσία συνολικά 50 συστατικών που αντιπροσωπεύουν το 94,46% έως 99,99% της σύστασης των ελαίων (**Παράρτημα**). Τα δώδεκα φυτοχημικά που προσδιορίστηκαν σε ποσοστά μεγαλύτερα του 10% θεωρήθηκαν ως τα κύρια συστατικά (**Πίνακας 3.3.2**). Αυτά περιλαμβάνουν ένα μονοκυκλικό μονοτερπένιο (γ -τερπινένιο), τρία δικυκλικά μονοτερπένια (σαμπινένιο, β -πινένιο και δ -3-καρένιο) και οχτώ οξυγονομένες ενώσεις (τα μονοτερπένια: ευκαλυπτόλη, D-φενχόνη, 2-εννεανόνη και 2-ενδεκανόνη και τις αρωματικές ενώσεις: εστραγόλη, καρβακρόλη, π -κυμένιο και μεθυλ-ευγενόλη).

Παρ' ότι το κάθε *taxon* διαθέτει ένα μοναδικό φυτοχημικό προφίλ, τα διαφορετικά *taxa* που μελετήθηκαν μπορούν να ομαδοποιηθούν βάσει των κυρίαρχων συστατικών των αιθερίων ελαίων τους. Έτσι, η λυγαριά (*Vitex agnus-castus*) και το ελληνικό φασκόμηλο (*Salvia fruticosa*) χαρακτηρίζονται από αιθέρια έλαια που είναι πλούσια σε ευκαλυπτόλη (Π.Ε.Α.Ε.), ενώ μια άλλη χαρακτηριστική ομάδα που προκύπτει από τα αποτελέσματα αυτά είναι τα αιθέρια έλαια πλούσια σε καρβακρόλη (Π.Κ.Α.Ε.), τα οποία προέρχονται από την υδρο-απόσταξη των ειδών *Thymbra capitata* (θυμάρι το κεφαλωτό), *Origanum onites* (ρίγανη) και *Satureja thymbra* (θρούμπι). Τα υπόλοιπα *taxa* παρουσιάζουν μοναδικούς χημειότυπους, με τον απήγανο (*Ruta chalepensis*) να χαρακτηρίζεται από τις κετόνες 2-εννεανόνη και 2-

ενδεκανόνη, το *Echinophora tenuifolia* ssp. *sibthorpiana* από τα συστατικά μεθυλ-ευγενόλη και π-κυμένιο και το μάραθο (*Foeniculum vulgare*) από εστραγόλη, (+)-3-καρένιο και D-φενχόνη.

Πίνακας 3.3.2. Κύρια συστατικά (<10%) των αιθερίων ελαίων των 8 αρωματικών-αρτυματικών taxa.

| Συστατικά | V 01 | V 05 | V 06 | V 09 | V 10 | V 12 | V 14 | V 15 | V 16 |
|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| σαμπινένιο | 0,29 | | 0,05 | | | 0,12 | 0,05 | 20,72 | |
| β-πινένιο | 0,13 | | 0,09 | 12,93 | 0,10 | 0,10 | 0,05 | | 1,38 |
| (+)-3-καρένιο | | | | | 0,11 | 0,08 | 19,73 | 0,03 | 0,10 |
| π-κυμένιο | | 1,23 | 10,34 | | 6,87 | 4,68 | 0,69 | 0,26 | 14,45 |
| ευκαλυπτόλη | | | | 53,95 | | | | 30,72 | |
| γ-τερπινένιο | 0,08 | | 0,60 | 1,02 | 9,26 | 4,28 | 1,48 | 2,66 | 19,90 |
| D-φενχόνη | | | | | | | 14,54 | | |
| 2-εννεανόνη | 52,69 | | | | | | | | |
| εστραγόλη | | | | | | | 36,37 | | |
| 2-2-ενδεκανόνη | 32,38 | | | | | | | | |
| καρβακρόλη | | | 0,47 | | 70,04 | 75,05 | | | 44,66 |
| μεθυλ-ευγενόλη | | 94,16 | 43,75 | | | | | | |
| Σύνολο | 85,57 | 95,39 | 55,30 | 67,90 | 86,38 | 84,31 | 72,91 | 54,39 | 80,49 |

Τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες για τα κύρια συστατικά των αιθερίων ελαίων των υπό μελέτη taxa. Τα αιθέρια έλαια του απήγανου αναφέρεται ότι κυριαρχούνται από τις αλειφατικές κετόνες 2-εννεανόνη και 2-ενδεκανόνη (Ali et al., 2013; Peresterelo et al., 2016), ενώ η ευκαλυπτόλη και το σαμπινένιο έχουν αναφερθεί ως τα κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου της λυγαριάς (Senatore et al., 1996; Stojković et al., 2011). Όσον αφορά το ελληνικό φασκόμηλο, η κυριαρχία της ευκαλυπτόλης στο αιθέριο έλαιο που παράγει έχει αναφερθεί και από άλλους μελετητές (Karousou et al., 1998; Aşkun et al., 2010), ενώ το αιθέριο έλαιο του μάραθου είναι πλούσιο σε εστραγόλη και D-φενχόνη (Rather et al., 2016). Στα αιθέρια έλαια του υποείδους *Echinophora tenuifolia* ssp. *sibthorpiana* έχουν αναφερθεί ως κύρια συστατικά η μεθυλ-ευγενόλη, το α-φελλανδρένιο, το δ-3-καρένιο και το π-κυμένιο (Baser et al., 1994; Chalchat et al., 2007). Τα αιθέρια έλαια των *Thymbra capitata* (θυμάρι το κεφαλωτό), *Origanum onites* (ρίγανη) και *Satureja thymbra* (θρούμπι) είναι γνωστά ως πλούσια σε καρβακρόλη (Kokkini and Vokou, 1989; Kokkini et al., 2003; Economou et al., 2014; Giatropoulos et al., 2018).

3.3.2. Βιοδραστικότητα

Τα αιθέρια έλαια των αρωματικών-αρτυματικών *taxa* που επιλέχθηκαν προς περαιτέρω μελέτη αξιολογήθηκαν ως προς την προνυμοφοκτόνο και απωθητική τους δράση έναντι του είδους *Ae. albopictus*. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα αιθέρια έλαια των ειδών *Thymbra capitata* (V10), *Origanum onites* (V12) και *Satureja thymbra* (V16), που ανήκουν στην οικογένεια των Χειλανθών και έχουν ως βασικό χαρακτηριστικό την καρβακρόλη, εμφάνισαν ταυτόχρονα ισχυρή προνυμοφοκτόνο και απωθητική δράση, αναδεικνύοντας τα πλούσια σε καρβακρόλη αιθέρια έλαια (Π.Κ.Α.Ε.) ως πολύ σημαντικούς παράγοντες ελέγχου των κουνουπιών για ευρεία εφαρμογή. Στη συνέχεια συζητούνται αναλυτικά τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών προνυμοφοκτονίας και απωθητικότητας των υπό μελέτη αιθερίων ελαίων των οχτώ αρωματικών-αρτυματικών *taxa*.

3.3.2.1. Προνυμοφοκτόνος δράση

Τα αποτελέσματα της προνυμοφοκτόνου δράσης των εννέα αιθερίων ελαίων που προέρχονται από τα αρωματικά-αρτυματικά *taxa* έναντι του είδους *Aedes albopictus* παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.3.3**. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως τα μέσα ποσοστά νεκρών προνυμφών 24 ώρες μετά την εφαρμογή των υπό μελέτη αιθερίων ελαίων. Η δράση των αιθερίων ελαίων ταξινομήθηκε σε «χαμηλή», «μέτρια» και «ισχυρή», ανάλογα με τα μέσα ποσοστά θνησιμότητας προνυμφών που προκαλούν και κυμαίνονται αντίστοιχα μεταξύ 0–50%, 50–80% και 80–100%. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, τα αιθέρια έλαια των ειδών *Thymbra capitata* (V10) και *Origanum onites* (V12) εμφανίζουν την ισχυρότερη δράση, προκαλώντας την απόλυτη (100%) θνησιμότητα των προνυμφών. Στην ίδια κατηγορία μπορεί να συμπεριληφθεί και το θρούμπι (V16) που προκαλεί 96% θνησιμότητα προνυμφών. Η δεύτερη ομάδα των αιθερίων ελαίων που εμφάνισε σημαντική προνυμοφοκτόνο θνησιμότητα ήταν από των *taxa* *Foeniculum vulgare* (V14) (80% θνησιμότητα), *Ruta chalepensis* (V01) (75% θνησιμότητα) και την όξινη υδρο-απόσταξη *Echinophora tenuifolia* ssp. *sibthorpiana* (V06) (66% θνησιμότητα). Μια τρίτη ομάδα αιθερίων ελαίων, τα οποία παραλαλήφθηκαν από τα *Echinophora tenuifolia* ssp. *sibthorpiana* (V05), *Vitex agnus-castus* (V15) και *Salvia fruticosa* (V09), παρουσίασε χαμηλή έως μηδαμινή προνυμοφοκτόνο δράση.

Πίνακας 3.3.3. Τοξική δράση των αιθερίων ελαίων των οχτώ αρωματικών-αρτυματικών taxa εναντίον προνυμφών 3^{ης} - 4^{ης} ηλικίας *Aedes albopictus* εκφρασμένη ως μέσο ποσοστό νεκρών προνυμφών (\pm Τυπικό Σφάλμα Μέτρησης, Τ.Σ.Μ.) 24 ώρες μετά την εφαρμογή.

| Κωδικός | Μέσο ποσοστό (\pm Τ.Σ.Μ.) νεκρών προνυμφών | Ταξινόμηση |
|---------|---|------------|
| V01 | 75,00 \pm 4,18 | μέτρια |
| V05 | 42 \pm 2 | χαμηλή |
| V06 | 66 \pm 4 | μέτρια |
| V09 | 2 \pm 2 | χαμηλή |
| V10 | 100 \pm 0 | ισχυρή |
| V12 | 100 \pm 0 | ισχυρή |
| V14 | 80,00 \pm 8,37 | ισχυρή |
| V15 | 14,00 \pm 6,78 | χαμηλή |
| V16 | 96 \pm 4 | ισχυρή |
| DMSO | 0 \pm 0 | - |

DMSO: dimethyl sulfoxide (μάρτυρας)

Τα αιθέρια έλαια των *Thymbra capitata* και *Echinophora tenuifolia ssp. sibthorpiana* δεν έχουν αξιολογηθεί στο παρελθόν ως προς τη βιοδραστικότητά τους έναντι των αρθροπόδων. Για το αιθέριο έλαιο του *Thymbra capitata* έχει μελετηθεί η μυκητοκτόνος και νηματοκτόνος δράση (Saoud et al., 2010), οι αντιπαρασιτικές (Machado et al., 2010) και αντιβακτηριακές (Karamproula et al., 2016) ιδιότητες και κυρίως η ικανότητά του να αναστέλλει τη δράση των ενζύμων λιποξυγενάση και ακετυλοχολινεστεράση (Carrasco et al., 2016). Το αιθέριο έλαιο του *Echinophora tenuifolia ssp. sibthorpiana* έχει επίσης μελετηθεί ως προς τις αντιβακτηριακές και αντιμυκητιακές του ιδιότητες (Gokbulut et al., 2013). Όσον αφορά τα είδη *Salvia fruticosa*, *Origanum onites* και *Vitex agnus-castus*, ενώ έχουν εμφανίσει προνυμφοκτόνο δράση έναντι διαφορετικών αρθροπόδων, δεν υπάρχουν αναφορές για τη δράση τους εναντίον των προνυμφών των ειδών *Aedes*. Το ελληνικό φασκόμηλο έχει εμφανίσει μέτρια έως χαμηλή προνυμφοκτόνο δράση έναντι του *Culex pipiens* (Koliopoulos et al., 2010). Σε πρόσφατη βιβλιογραφική ανασκόπηση των βιολογικών δράσεων των αιθερίων ελαίων της ρίγανης (*Origanum onites*), μεταξύ άλλων αναφέρεται και η ισχυρή προνυμφοκτόνος δράση που παρουσιάζουν έναντι του *Culex pipiens* (Tere et al., 2016). Έναντι προνυμφών του *Culex pipiens* έχει μελετηθεί και η δράση του αιθερίου ελαίου της λυγαριάς παρουσιάζοντας, ωστόσο, χαμηλή τοξικότητα (Cetin et al., 2011). Τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών, για τη δράση των αιθερίων ελαίων των ειδών *Salvia fruticosa*, *Origanum onites* και *Vitex agnus-castus* στις προνύμφες του *Culex pipiens* συνάδουν με τα αποτελέσματα της προνυμφοκτόνου δράσης των αντίστοιχων υπό μελέτη αιθερίων ελαίων έναντι του *Aedes albopictus*.

Όσον αφορά τα αιθέρια έλαια του *Satureja thymbra* (θρούμπι), αυτά έχουν παρουσιάσει

σημαντική δράση εναντίον προνυμφών των ειδών *Culex pipiens biotype molestus* (Michaelakis et al., 2007), *Anopheles gambiae* (Dellagli et al., 2012), αλλά και πρόσφατα εναντίον του *Aedes albopictus* (Giatropoulos et al., 2018). Συγκεκριμένα, εναντίον των προνυμφών του *Aedes albopictus* η δράση των αιθερίων ελαίων από το θρούμπι αξιολογήθηκε ως ικανοποιητική, παρουσιάζοντας τιμή LC_{50} στα 53,3 mg/l (Giatropoulos et al., 2018). Έναντι των προνυμφών του είδους *Aedes albopictus* έχει αξιολογηθεί και η δράση των αιθερίων ελαίων των ειδών *Foeniculum vulgare* και *Ruta chalepensis*. Οι Conti et al. (2010) αξιολόγησαν τα αιθέρια έλαια του μάραθου ως ισχυρά προνυμφοκτόνα έναντι του *Aedes albopictus*. Σε μελέτη που συνέκρινε τη δράση 10 διαφορετικών ελαίων, το αιθέριο έλαιο του μάραθου και του απήγανου παρουσίασαν ισχυρή προνυμφοκτόνο δράση έναντι του *Aedes albopictus*, με τον απήγανου να εμφανίζει την ισχυρότερη δράση ανάμεσα στα υπό μελέτη είδη (Benelli et al., 2014). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρουσιάσει και άλλες μελέτες της τοξικής δράσης του αιθερίου ελαίου του απήγανου σε προνύμφες του *Aedes albopictus* (Conti et al., 2013) και του *Aedes aegypti* (Ali et al., 2013). Τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της προνυμφοκτόνου δράσης των υπό μελέτη αιθερίων ελαίων των ειδών *S. thymbra*, *F. vulgare* και *R. chalepensis* εναντίον του *Aedes albopictus*.

Σύμφωνα με τα συνδυαστικά αποτελέσματα της χημικής σύστασης και της προνυμφοκτόνου δράσης των υπό μελέτη αιθερίων ελαίων, φάνηκε ότι τα Π.Κ.Α.Ε. που προέρχονται από την υδρο-απόσταξη των ειδών *Thymbra capitata*, *Origanum onites* και *Satureja thymbra* παρουσιάζουν την ισχυρότερη δράση. Παρ' ότι τα δύο πρώτα είδη δεν έχουν μελετηθεί ως προς την προνυμφοκτόνο δράση τους έναντι του είδους *Aedes albopictus*, η ισχυρή δράση των Π.Κ.Α.Ε. έναντι των προνυμφών του είδους αυτού έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές. Οι Koliopoulos et al. (2018) αναφέρουν ότι το αιθέριο έλαιο του *Thymus vulgaris*, με κυρίαρχο συστατικό τη θυμόλη, και των *Origanum vulgare*, *O. dictamnus*, *O. mantzurianum* και *Satureja thymbra*, με κυρίαρχο συστατικό την καρβακρόλη, παρουσίασαν την ισχυρότερη δράση ανάμεσα στα 14 είδη της οικογένειας *Lamiaceae* που μελέτησαν, με τιμές LC_{50} να κυμαίνονται μεταξύ 20,5–53,3 mg/l. Στην ίδια μελέτη, τα φυτοχημικά θυμόλη και καρβακρόλη παρουσίασαν την ισχυρότερη προνυμφοκτόνο δράση (LC_{50} 12.9 και 13 mg/l, αντίστοιχα) ανάμεσα στα 24 μεμονωμένα συστατικά που μελετήθηκαν. Αντίστοιχα, ισχυρή τοξική δράση έχει εμφανίσει η καρβακρόλη και σε προνύμφες *Culex pipiens* (Traboulsi et al., 2002; Radwan et al., 2008). Επομένως, τα παραπάνω αποτελέσματα αναδεικνύουν την καρβακρόλη και τα Π.Κ.Α.Ε. ως πολλά υποσχόμενους παράγοντες για τον πληθυσμιακό έλεγχο των κουνουπιών.

3.3.2.2. Απωθητική δράση

Στον Πίνακα 3.3.4 συνοψίζονται τα αποτελέσματα της απωθητικής δράσης των εννέα αιθερίων ελαίων που προέρχονται από την υδρο-απόσταξη των οχτώ υπό μελέτη αρωματικών-αρτυματικών taxa έναντι του *Aedes albopictus*. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος αριθμός προσγειώσεων των τελείων του *Aedes albopictus* στο ακάλυπτο τμήμα του εμποτισμένου με αιθέριο έλαιο γαντιού, μετά από 5 λεπτά έκθεσης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, τα αιθέρια έλαια των ειδών *Salvia fruticosa* (V09), *Thymbra capitata* (V10), *Origanum onites* (V12) και *Satureja thymbra* (V16) εμφάνισαν απωθητική δράση όμοια με αυτή του συνθετικού απωθητικού DEET (N,N-Diethyl-meta-toluamide), επιτυγχάνοντας 100% απωθητικότητα κατά τη διάρκεια των 5 λεπτών έκθεσης. Ως ισχυρά απωθητικά αξιολογήθηκαν και τα αιθέρια έλαια που προέκυψαν τόσο από την κλασική υδρο-απόσταξη (V05), όσο και από την όξινη υδρο-απόσταξη (V06) του *Echinophora tenuifolia ssp. sibthorpiana*, καθώς και το αιθέριο έλαιο της λυγαριάς (*Vitex agnus-castus*) (V15) εμφανίζοντας αντίστοιχα 99,87, 99,12 και 98,75% απωθητικότητες. Τα αιθέρια έλαια του μάραθου (*Foeniculum vulgare*) (V14) και του απήγανου (*Ruta chalepensis*) (V01) παρουσίασαν καλή έως ικανοποιητική απωθητική δράση, πετυχαίνοντας αντίστοιχα 96,5 και 88,87% απωθητικότητα.

Πίνακας 3.3.4. Απωθητική δράση των αιθερίων ελαίων των οχτώ αρωματικών-αρτυματικών taxa εναντίον τελείων *Aedes albopictus* εκφρασμένη ως μέσος αριθμός προσγειώσεων (\pm Τυπικό Σφάλμα Μέτρησης, Τ.Σ.Μ.) μετά από 5 λεπτά έκθεσης.

| Κωδικός | Μέσος αριθμός (\pm Τ.Σ.Μ.) προσγειώσεων / 5 λεπτά | P_{DEET} | P_{DCM} |
|---------|---|-------------------|------------------|
| V01 | 11,13 \pm 2,65 | 0,0003* | 0,0008* |
| V05 | 0,88 \pm 0,74 | 0,1441 | 0,0006* |
| V06 | 0,13 \pm 0,13 | 0,3173 | 0,0005* |
| V09 | 0 \pm 0 | 1 | 0,0003* |
| V10 | 0 \pm 0 | 0,3173 | 0,0005* |
| V12 | 0 \pm 0 | 1 | 0,0003* |
| V14 | 3,5 \pm 1,65 | 0,0008* | 0,0107* |
| V15 | 1,25 \pm 0,59 | 0,0103* | 0,0007* |
| V16 | 0 \pm 0 | 1 | 0,0003* |
| DEET | 0 \pm 0 | - | - |
| DCM | 56 \pm 4 | - | - |

DEET: N,N-Diethyl-meta-toluamide (θετικός μάρτυρας)

DCM: dichloromethane (μάρτυρας)

* Σημαντική Διαφορά ($d.f. = 1, \alpha = 0.05$)

Ανάμεσα στα οχτώ taxa που μελετήθηκαν ως προς την απωθητική τους δράση έναντι του είδους *Aedes albopictus*, τα αιθέρια έλαια των *Thymbra capitata* και *Echinophora tenuifolia* ssp. *sibthorpiana* δεν έχουν μελετηθεί ξανά ως προς την εντομο-απωθητική τους δράση. Επιπλέον, είναι περιορισμένες και οι μελέτες που αξιολογούν τις εντομο-απωθητικές ιδιότητες των αιθερίων ελαίων του ελληνικού φασκόμηλου (*Salvia fruticosa*), και καμία δεν αναφέρεται σε κουνούπια ως οργανισμό-στόχο. Υπάρχει μια μόνο μελέτη, στην οποία αναφέρεται ότι το αιθέριο έλαιο του *Origanum onites* διαθέτει ισχυρή απωθητική δράση έναντι του είδους *Aedes aegypti*, όμοια με αυτή του DEET (Caroll et al., 2017). Αντίθετα, τα αιθέρια έλαια των ειδών *Ruta chalepensis*, *Vitex agnus-castus* και *Foeniculum vulgare* έχουν μελετηθεί εκτενώς ως προς την απωθητική τους δράση έναντι των κουνουπιών. Το αιθέριο έλαιο του μάραθου έχει στο παρελθόν προσδιοριστεί ότι διαθέτει ισχυρή απωθητική δράση έναντι του είδους *Culex pipiens* (Traboulsi et al., 2005), αλλά μέτρια δράση κατά του *Aedes aegypti* (Kim et al., 2002; Chochochote et al., 2007). Το αιθέριο έλαιο της λυγαριάς έχει και αυτό αξιολογηθεί ως προς την απωθητική του δράση έναντι των ειδών *Aedes aegypti* (Semmler et al., 2009, 2014) και *Culex quinquefasciatus* (Semmler et al., 2014), χωρίς ωστόσο να δείξει κάποια αξιόλογη δράση. Η απωθητική δράση του αιθερίου ελαίου του απήγανου έχει μελετηθεί στο παρελθόν για το είδος *Aedes albopictus*, παρουσιάζοντας ισχυρή δράση (Ali et al., 2013; Conti et al., 2013). Όσο για το θρούμπι (*Satureja thymbra*), πρόσφατα αξιολογήθηκε ως προς την απωθητική δράση του ελαίου έναντι του είδους *Aedes albopictus* εμφανίζοντας την ισχυρότερη δράση, μαζί με τη μαντζουράνα (*Origanum mantzuranum*), ανάμεσα στα 14 είδη της οικογένειας Lamiaceae που μελετήθηκαν (Giatropoulos et al., 2018). Παρ' ότι η απωθητική δράση για το είδος *Aedes albopictus* έχει αξιολογηθεί μόνο για το απήγανο και το θρούμπι, τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών, με εξαίρεση τη λυγαριά, συμφωνούν με αυτά των υπό μελέτη αιθερίων ελαίων, όσον αφορά την απωθητική τους δράση σε άλλα είδη κουνουπιών.

Η ισχυρή δράση που παρουσίασαν τα αιθέρια έλαια των *Thymbra capitata*, *Origanum onites* και *Satureja thymbra* αποδίδεται κατά κύριο λόγο στην παρουσία της καρβακρόλης, η οποία προσδιορίστηκε ως το κυριότερο συστατικό τους σε μεγάλη περίσσεια. Η καρβακρόλη έχει παρουσιάσει ισχυρή απωθητική δράση εναντίον των ειδών *Culex pipiens pallens* (Choi et al. 2002; Park et al. 2005) και πρόσφατα εναντίον του *Aedes albopictus* (Giatropoulos et al., 2018). Συγκεκριμένα εναντίον του *Aedes albopictus*, η καρβακρόλη εμφάνισε την ισχυρότερη δράση ανάμεσα στα 24 φυτοχημικά που μελετήθηκαν, παρουσιάζοντας 100% απωθητικότητα ακόμα και στην μικρότερη συγκέντρωση που εφαρμόστηκε (0,04 mg/cm²). Τα αιθέρια έλαια των ειδών *Salvia fruticosa* και *Vitex agnus-castus* που επίσης εμφάνισαν ισχυρή

προνυμοφοκτόνο δράση, έχουν ως κύριο συστατικό την ευκαλυπτόλη. Το μόριο της ευκαλυπτόλης (1,8-κινεόλη) έχει προσδιοριστεί να διαθέτει σημαντική απωθητική δράση για το είδος *Aedes aegypti*, λειτουργώντας ως ανασχετικό λήψης τροφής και παρεμποδιστής της ωοτοκίας του (Klocke et al., 1987), ενώ η απωθητική του δράση έναντι του *Aedes albopictus* είναι χαμηλή (Giatropoulos et al., 2018). Η ισχυρή δράση που εμφάνισαν στη διατριβή τα πλούσια σε ευκαλυπτόλη αιθέρια έλαια (Π.Ε.Α.Ε.) πιθανόν να οφείλεται στη συνεργιστική δράση της ευκαλυπτόλης με τα δευτερεύοντα φυτοχημικά που περιέχουν. Αντίστοιχα, η ισχυρή προνυμοφοκτόνος δράση του αιθερίου ελαίου του υποείδους *Echinophora tenuifolia* ssp. *sibthorpiana* μπορεί να αποδοθεί στη συνεργιστική δράση των κύριων συστατικών του μεθυλεγγενόλη και π-κυμένιο.

Με βάση τα συνδυαστικά αποτελέσματα της φυτοχημικής ανάλυσης και της απωθητικής δράσης των υπό μελέτη αιθερίων ελαίων, τα Π.Κ.Α.Ε. αναδεικνύονται ως ιδιαίτερα αποτελεσματικά απωθητικά του είδους *Aedes albopictus*. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με αυτά προηγούμενης μελέτης στην οποία τα αιθέρια έλαια των ειδών *Origanum dictamnus*, *O. mantzuranum* και *Satureja thymbra*, με κυρίαρχο συστατικό την καρβακρόλη, ήσαν ανάμεσα σε αυτά που παρουσίασαν την ισχυρότερη απωθητική δράση κατά του *Aedes albopictus* (Giatropoulos et al., 2018).

Κεφάλαιο 4.

Βιοδοκιμές πεδίου

4.1. Εισαγωγή

Η διερεύνηση της φυτικής βιοποικιλότητας για την ανακάλυψη φυσικών βιοκτόνων, έχει αναδείξει τα αιθέρια έλαια ως μια πολύτιμη πηγή βιοδραστικών ουσιών. Η σημαντική απωθητική και προνυμφοκτόνος δράση που εμφανίζουν πολλά από αυτά έναντι των κουνουπιών, σε συνδυασμό με το ασφαλές περιβαλλοντικό τους προφίλ, καθιστούν τα αιθέρια έλαια ως δυνητικούς παράγοντες για τη διαχείριση των μολυσματικών νόσων που μεταφέρονται μέσω των κουνουπιών. Παρά τη διεξοδική μελέτη της δράσης τους σε εργαστηριακό επίπεδο, οι προνυμφοκτόνες ιδιότητές τους παραμένουν εμπορικά ανεκμετάλλευτες και η έλλειψη επαρκών αποτελεσμάτων από δοκιμές πεδίου αναφέρεται ως ένας από τους κυριότερους περιοριστικούς παράγοντες για την ανάπτυξη προϊόντων προς αυτήν την κατεύθυνση (Chellappandian et al., 2018).

Για τη θεραπεία της έλλειψης αυτής, η παρούσα διατριβή έρχεται να καλύψει το κενό που έχει παρατηρηθεί, προτείνοντας μία νέα μεθοδολογία, υπό τύπο κλιμακωτής πορείας για την ανάπτυξη αιθερίων ελαίων ως απωθητικών και προνυμφοκτόνων των κουνουπιών. Η πορεία αυτή ξεκινά από το επίπεδο των εργαστηριακών βιοδοκιμών και καταλήγει στις εφαρμογές πεδίου. Το χαρακτηριστικό είναι ότι μεταξύ των δύο αυτών επιπέδων εισάγεται και ένα τρίτο επίπεδο, προκειμένου να καταστεί δυνατή η αύξηση της κλίμακος των βιοδοκιμών. Αυτή περιλαμβάνει τα ακόλουθα τρία ενδιάμεσα στάδια: α) τον προσδιορισμό της βέλτιστης συγκέντρωσης (μελέτη δόσης-απόκρισης), β) τη μελέτη της οικο-τοξικότητάς τους, και γ) την ανάπτυξη παρασκευάσματος των αιθερίων ελαίων. Η ιεραρχική αυτή πορεία έχει ως στόχο την μεγιστοποίηση της αποτελεσματικότητας του τελικού προϊόντος, αλλά και την αντιμετώπιση προκλήσεων, όσον αφορά την επιλογή της τοποθεσίας των πειραμάτων πεδίου και τις πιθανές επιπτώσεις στο περιβάλλον. Η προσέγγιση αυτή μπορεί να θεωρηθεί ως μεθοδολογικό πρότυπο σχεδίασης αντίστοιχων πειραμάτων, που αποτελούν βασική προϋπόθεση για την ένταξη των φυσικών βιοκτόνων στα μέσα που προτείνει ο Π.Ο.Υ. για την αντιμετώπιση των μολυσματικών νόσων (WHO, 2005). Επιπλέον, στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί η σημασία της συνεργασίας μεταξύ των διαφορετικών θεσμικών φορέων που συνέβαλλαν στην υλοποίηση των πειραμάτων πεδίου. Συγκεκριμένα, η συμβολή του ακαδημαϊκού χώρου, των ερευνητικών

ινστιτούτων και των τοπικών αρχών υπήρξε καθοριστική για την εξέλιξη της έρευνας, διευκολύνοντας την επιλογή των κατάλληλων πειραματικών περιοχών και την άμεση υλοποίηση των πειραμάτων πεδίου στην Περιφέρεια Emilia Romagna της Ιταλίας.

4.2. Υλικά και Μέθοδοι

4.2.1. Αιθέριο έλαιο δοκιμών πεδίου, χημικά και πρότυπα

Μετά την πρώτη -σε εργαστηριακό επίπεδο εκτίμηση- της απωθητικής και προνυμοφοκτόνου δράσης των αιθερίων ελαίων που προέρχονται από τις τρεις υπό μελέτη ομάδες της ελληνικής βιοποικιλότητας (αυτοφύης, αγροτική και διατροφική-αρωματική) έναντι του *Aedes albopictus*, τα πλούσια σε καρβακρόλη αιθέρια έλαια (Π.Κ.Α.Ε.) προκρίθηκαν ως η πλέον πρόσφορη προς περαιτέρω ανάπτυξη ομάδα αιθερίων ελαίων. Στο πλαίσιο αυτό, αναζητήθηκε προς επιλογή και περαιτέρω ανάπτυξη ένα ευρέως διαθέσιμο-καλλιεργούμενο ταχον, με αντίστοιχα χαρακτηριστικά (απόδοση, περιεχόμενο, βιοδραστικότητα), το οποίο θα είναι ικανό να παράγει σημαντικές ποσότητες Π.Κ.Α.Ε. Ως τέτοιο, επελέγη, μετά από στοχευμένη δειγματοληψία κατά το έτος 2015, η εμπορική ποικιλία *Origanum vulgare* ssp. *hirtum*. Η προμήθεια των αιθερίων ελαίων της ποικιλίας αυτής, που χρησιμοποιήθηκαν για τις μελέτες δόσης-απόκρισης, οικο-τοξικότητας, καθώς και στις δοκιμές πεδίου, έγινε από την εταιρεία Ecopharm Hellas S.A.

Η προμήθεια της καθαρής καρβακρόλης (96%) και TWEEN® 20 (97%) έγινε από την εταιρεία Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Η πρώτη χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο αναφοράς κατά τις εργαστηριακές βιοδοκιμές και το δεύτερο ως γαλακτοματοποιητής στα παρασκευάσματα του αιθερίου ελαίου ρίγανης που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων πεδίου. Η προμήθεια των DEET (N,N-διμεθυλο-3-μεθυλοβενζαμίδιο) και DMSO (διμεθυλο σουλφοξίδιο) έγινε επίσης από την εταιρεία Sigma-Aldrich.

4.2.2. Προσδιορισμός της χημικής σύστασης του αιθερίου ελαίου ρίγανης

Ο ποιοτικός-ποσοτικός προσδιορισμός της χημικής σύστασης του αιθερίου ελαίου της ρίγανης (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) πραγματοποιήθηκε με Αέρια Χρωματογραφία συνδυασμένη με Φασματομετρία Μαζών (Gas Chromatography - Mass Spectrometry, GC-MS) με τη χρήση συσκευής Αέριας Χρωματογραφίας Agilent Technologies 7890A, εξοπλισμένη με

χρωματογραφική στήλη τύπου HP 5MS (30m x 0.25mm x 0.25μm), συνδεδεμένη σε σειρά με Φασματογράφο Μάζας Agilent 5957C, VL, εξοπλισμένο με ανιχνευτή τριπλού άξονα. Η αρχική θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 60 °C και προγραμματίστηκε να φτάσει στους 280 °C, με ρυθμό αύξησης 3 °C ανά λεπτό. Οι θερμοκρασίες εισαγωγής και ανίχνευσης ρυθμίστηκαν στους 230 και 300 °C, αντίστοιχα. Ως αέριο μεταφοράς χρησιμοποιήθηκε το Ήλιο (He) με ρυθμό ροής 1 mL/min . Η αναγνώριση των συστατικών στηρίχθηκε: α) στη σύγκριση με το Δείκτη Ανάσχεσης (Retention Index-RI) εκάστου συστατικού (Van den Dool and Kratz, 1963) για τον υπολογισμό του οποίου χρησιμοποιήθηκε ένα πρότυπο μίγμα κανονικών αλκανίων (C₅-C₂₄) και η σύγχρονη διεθνής βιβλιογραφία (Adams, 2007), β) στο φάσμα μάζας του κάθε συστατικού, το οποίο και συγκρίθηκε με την χρήση εξειδικευμένων βάσεων δεδομένων (NIST/NBS, Wiley library spectra, κτλ), αλλά και την διαθέσιμη ειδική βιβλιογραφία (Adams, 1995; Massada, 1976) και γ) στη σύγκριση με το χρόνο κατακράτησης εμπορικά διαθέσιμων μορίων.

4.2.3. Εκτροφή κουνουπιών και οργανισμών μη-στόχων

Η εκτροφή του κουνουπιών του είδους *Aedes albopictus* για τις ανάγκες των πειραμάτων δόσης-απόκρισης πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, στην Κηφισιά, όπως περιγράφεται από τους Giatoroulos et al. (2012). Τα ακμαία *Macrocylops albidus* (Copepoda, Cyclopidae) που χρησιμοποιήθηκαν για τις εργαστηριακές βιοδοκιμές τοξικότητας, προήλθαν από τη μονάδα εκτροφής του Εργαστηρίου Ιατρικής και Κτηνιατρικής Εντομολογίας του Κέντρου Γεωργίας και Περιβάλλοντος “G. Nicoli” (Veronesi et al., 2015).

4.2.4. Πειράματα δόσης-απόκρισης

Για τη μελέτη της τοξικής δράσης των διαφορετικών δόσεων του αιθερίου ελαίου ρίγανης και της καρβακρόλης έναντι των προνυμφών *Ae. albopictus*, η πειραματική μεθοδολογία που ακολουθήθηκε ήταν αυτή που προτείνεται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) για τον έλεγχο της ευαισθησίας ή της ανθεκτικότητας των προνυμφών των κουνουπιών στα εντομοκτόνα (WHO, 2005), με μερικές τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, 20 προνύμφες *Ae. albopictus* από την εργαστηριακή εκτροφή, ανεπτυγμένης 3^{ης} ή 4^{ης} νεαρής ηλικίας, τοποθετήθηκαν σε κυλινδρικό δοχείο με υδατικό διάλυμα περιεκτικότητας 2% v/v σε DMSO (98 ml νερό δικτύου + 2 ml DMSO). Η προσθήκη του DMSO στο νερό αποσκοπεί στην

ομοιόμορφη κατανομή των οργανικών συστατικών σε υδατικό περιβάλλον. Στη συνέχεια ακολούθησε η προσθήκη των επιθυμητών δόσεων από το πρότυπο διάλυμα των ουσιών (10 % w/v σε DMSO). Τόσο το αιθέριο έλαιο της ρίγανης, όσο και η καρβακρόλη μελετήθηκαν σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις (1, 4, 16, και 64 mg/L) με σκοπό να μελετηθεί η μεταβολή της θνησιμότητας σε συνάρτηση με τη μεταβολή της δόσης. Για κάθε δόση πραγματοποιήθηκαν τέσσερις επαναλήψεις, σε συνδυασμό με μία επέμβαση μάρτυρα που περιείχε υδατικό διάλυμα περιεκτικότητας 1% v/v σε DMSO. Τα δοχεία διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, σχετική υγρασία $80\pm 2\%$ και φωτοπερίοδο 16:8 ωρών (φώς:σκόταδι). Η τοξική δράση του αιθερίου ελαίου και της καρβακρόλης προσδιορίστηκε με την καταγραφή της θνησιμότητας των προνυμφών 24 ώρες μετά την εφαρμογή. Κατά το διάστημα αυτό δεν χορηγήθηκε τροφή στις προνύμφες.

Για τον προσδιορισμό της απωθητικής δράσης των διαφορετικών δόσεων του αιθερίου ελαίου ρίγανης και της καρβακρόλης έναντι των ακμαίων του *Ae. albopictus* ακολουθήθηκε πρωτόκολλο πειραματισμού (Giatropoulos et al., 2013) βασισμένο στον αριθμό των προσγειώσεων (landings) των κουνουπιών στο ανθρώπινο δέρμα (Coleman et al. 1993, Govere and Durrheim 2006). Οι βιοδοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε ξύλινους κλωβούς (33x33x33 cm) με τις 3 πλευρές τους καλυμμένες με λεπτή σήτα (32x32 cm) και άνοιγμα διαμέτρου 20 cm στο πίσω μέρος, με υφασμάτινο «μανίκι» που επιτρέπει την είσοδο του χεριού του παρατηρητή. Σε κάθε κλωβό τοποθετήθηκαν 100 τέλεια κουνούπια *Ae. albopictus*, με αναλογία φύλου 1:1, ηλικίας 5-10 ημερών, στα οποία είχε διακοπεί η χορήγηση τροφής (ζαχαρόνευρο) για 12 ώρες. Η διατήρηση των κλωβών και η διενέργεια των βιοδοκιμών πραγματοποιήθηκαν σε χώρους ελεγχόμενων συνθηκών θερμοκρασίας ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$), φωτοπερίοδου (16Φ:8Σ) και σχετικής υγρασίας (70-80%). Για τις βιοδοκιμές χρησιμοποιήθηκε πλαστικό γάντι στην πάνω πλευρά του οποίου και στο ύψος του καρπού υπήρχε άνοιγμα διαστάσεων 5 x 5 cm, περιμετρικά του οποίου τοποθετήθηκε διηθητικό χαρτί (Whatman chromatography paper) συνολικής επιφάνειας 24 cm², που έφερε την επιθυμητή δόση κάθε ουσίας. Το DEET, που χρησιμοποιήθηκε ως ο θετικός μάρτυρας, μελετήθηκε σε δύο δόσεις (0,2 και 0,1 μL/cm²), ενώ το αιθέριο έλαιο της ρίγανης και η καρβακρόλη μελετήθηκαν σε επτά διαφορετικές δόσεις (0,2-0,008 μL/cm²). Μετά την εφαρμογή των υπό μελέτη δόσεων στο διηθητικό χαρτί, το γάντι με το διηθητικό χαρτί εισήλθαν εντός του κλωβού για διάστημα 5 λεπτών. Εκτός από τον θετικό μάρτυρα με το DEET, χρησιμοποιήθηκε και μάρτυρας μόνο με την εφαρμογή του διαλύτη (διχλωρομεθάνιο, DCM) επί του διηθητικού χαρτιού. Κάθε επέμβαση επαναλήφθηκε 8 φορές (n=8), ενώ χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις διαφορετικοί εθελοντές για την εξαγωγή ασφαλών αποτελεσμάτων.

4.2.5. Μελέτη τοξικότητας στους οργανισμούς μη-στόχους

Οι βιοδοκιμές τοξικότητας στο μη στοχευμένο είδος *Macrocyclops albidus* πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τροποποιημένη εκδοχή της προτεινόμενης από τον Π.Ο.Υ. πειραματικής μεθόδου για τον έλεγχο της ευαισθησίας ή της ανθεκτικότητας των προνυμφών στα εντομοκτόνα (WHO, 2005). Συγκεκριμένα, 20 τέλεια κοπήποδα τοποθετήθηκαν σε κυλινδρικό δοχείο με υδατικό διάλυμα περιεκτικότητας 1% v/v σε DMSO (99 mL νερό δικτύου + 1 mL DMSO). Η προσθήκη του DMSO στο νερό συντελεί στην ομοιόμορφη κατανομή των οργανικών συστατικών σε υδατικό περιβάλλον. Τα κοπήποδα τράφθηκαν ελεύθερα (ad libitum) με νεαρές προνύμφες *Ae. albopictus* έως την ημέρα της μεταχείρισης. Κάθε ένα από τα υπό μελέτη προϊόντα (αιθέριο έλαιο ρίγανης και καρβακρόλη), μελετήθηκε σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις (1, 4, 16, και 64 mg/L). Για το σκοπό αυτό, αρχικά παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα αιθερίου ελαίου ρίγανης και καρβακρόλης σε DMSO περιεκτικότητας 10% w/v. Για κάθε δόση πραγματοποιήθηκαν τέσσερις επαναλήψεις, σε συνδυασμό με μία επέμβαση μάρτυρα που περιείχε υδατικό διάλυμα περιεκτικότητας 1% v/v σε DMSO. Τα δοχεία διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία 28 ± 1 °C, και φωτοπερίοδο 14:10 ωρών (φώς:σκόταδι). Η τοξική δράση των υπό μελέτη προϊόντων προσδιορίστηκε με την καταγραφή της θνησιμότητας των κοπήποδων 24 ώρες μετά την εφαρμογή. Στην περίπτωση που η θνησιμότητα που καταγραφόταν στο δοχείο του μάρτυρα ξεπερνούσε το 0,0%, η βιοδοκιμή επαναλαμβάνονταν.

4.2.6. Παρασκευή γαλακτώματος

Για την εφαρμογή του αιθερίου ελαίου ρίγανης στις δοκιμές πεδίου με σκοπό τον προσδιορισμό της απωθητικής του δράσης σε εξωτερικό χώρο, αλλά και της προνυμφοκτόνου δράσης του σε λεκάνες απορροής ομβρίων υδάτων παρασκευάστηκαν κατάλληλα γαλακτώματα αιθερίου ελαίου. Για τους ψεκασμούς εξωτερικού χώρου παρασκευάστηκε γαλάκτωμα περιεκτικότητας 91% σε νερό, 4% σε αιθέριο έλαιο ρίγανης και 5% σε TWEEN® 20. Για τα πειράματα της προνυμφοκτόνου δράσης παρασκευάστηκε γαλάκτωμα περιεκτικότητας 66,6% σε νερό, 16,7% σε αιθέριο έλαιο ρίγανης και 16,7% σε TWEEN® 20. Η επιλογή του γαλακτωματοποιητή TWEEN® 20 και των ειδικών αναλογιών στα παραπάνω μίγματα έγινε βάσει των αποτελεσμάτων μελετών πάνω στην επίδραση διαφορετικών παραγόντων στα φυσικά χαρακτηριστικά γαλακτωμάτων καρβακρόλης (Shaaban and Edris, 2015; Nash and Erk, 2017).

4.2.7. Προσδιορισμός της απωθητικής δράσης σε εξωτερικούς χώρους

Η δοκιμή πεδίου πραγματοποιήθηκε σε δημόσιο κήπο υψηλής βλάστησης στη Μπολόνια της Ιταλίας (**Εικόνα 4.1**), κατά τη δεύτερη εβδομάδα του Ιουλίου όταν οι πληθυσμοί *Ae. Albopictus* παρουσιάζουν τη μέγιστη πυκνότητά τους. Η πειραματική περιοχή χωρίστηκε σε δύο τμήματα εμβαδού 50 × 15m, από τα οποία η περιοχή Α αποτέλεσε το πειραματικό τμήμα, ενώ η περιοχή Β λειτούργησε ως η περιοχή μάρτυρας. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στις 12 Ιουλίου του 2017, στις 6.00μ.μ. Η περιοχή Α ψεκάστηκε με τη χρήση χειροκίνητου ψεκαστήρα Volpi (Casalromano, Mantova, Italy) (**Εικόνα 4.2**), με 10 L υδατικού διαλύματος περιεκτικότητας 5% σε TWEEN® 20 και 4% σε αιθέριο έλαιο ρίγανης, ενώ η περιοχή Β ψεκάστηκε με τον ίδιο όγκο υδατικού διαλύματος περιεκτικότητας 5% σε TWEEN® 20. Το υπό μελέτη προϊόν διαχύθηκε με ομοιογενή ψεκασμό στο γρασίδι και τη βλάστηση έως 3m ύψος, καλύπτοντας ολόκληρη την πειραματική περιοχή των 50 x 15m. Την ημέρα που προηγήθηκε των ψεκασμών (προ-πειραματική), την ημέρα των ψεκασμών (ημέρα πειράματος ή ημέρα 0) και για τις τρεις ημέρες που ακολούθησαν (μετά-πειραματική ημέρα 1, 2 και 3) πραγματοποιήθηκαν Συλλογές Προσγειώσεων στον Άνθρωπο (Σ.Π.Α.) εντός της πειραματικής περιοχής και της περιοχής μάρτυρα. Οι Σ.Π.Α., διάρκειας 30 λεπτών, πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση χειροκίνητου αναρροφητή από τέσσερεις ειδικούς χειριστές, τις ώρες κατά τις οποίες παρατηρείται η μέγιστη ενεργητικότητα των θηλυκών κουνουπιών (6–7 μ.μ.). Οι χειριστές εναλλάσσονταν καθημερινά για την εξαγωγή ασφαλών -αντικειμενικών- αποτελεσμάτων. Τα συλλεγμένα κουνούπια απελευθερώθηκαν με το πέρας της κάθε συλλογής – καταμέτρησης.



Εικόνα 4.1. Πειραματική περιοχή δοκιμών απωθητικής δράσης του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε εξωτερικό χώρο, Δημόσιος Κήπος, Μπολόνια, Ιταλία.



Εικόνα 4.2. Ψεκασμοί με χρήση χειροκίνητου ψεκαστήρα Volpi κατά τη διενέργεια των δοκιμών αποθητικής δράσης του αιθερίου ελαίου ρίγανης σε εξωτερικό χώρο.

4.2.8. Προσδιορισμός προνυμφοκτόνου και αποθητικής δράσης σε λεκάνες απορροής ομβρίων υδάτων

Η δοκιμή της προνυμφοκτόνου δράσης πραγματοποιήθηκε στο αστικό κέντρο του Crevalcore, της Περιφέρειας Emilia Romagna της Ιταλίας, κατά την καλοκαιρινή περίοδο από 13 Ιουλίου έως 3 Αυγούστου. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων επιλέχθηκαν τυχαία 15 λεκάνες απορροής ομβρίων υδάτων, που περιείχαν προνύμφες κουνουπιών. Σε πέντε από αυτές, εφαρμόστηκαν 10 mL αιθερίου ελαίου ρίγανης 100%, σε άλλες πέντε εφαρμόστηκαν 10 mL αιθερίου ελαίου ρίγανης + 10 mL TWEEN® 20 διαλυμένα σε 40 mL νερού, ενώ οι άλλες πέντε ήσαν οι μάρτυρες αναφοράς. Οι δειγματοληψίες των προνυμφών πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση διχτιού ενυδρείου, ακριβώς πριν την εφαρμογή, 48 ώρες μετά την εφαρμογή και στη συνέχεια 7, 14 και 21 ημέρες μετά την εφαρμογή. Ο αριθμός των προνυμφών και των νυμφών καταγράφηκε ανάλογα με το είδος και την ηλικία τους. Επιπλέον, σε κάθε δειγματοληψία καταγράφηκε η ώρα της δειγματοληψίας, η θερμοκρασία του νερού και της ατμόσφαιρας, καθώς και η ενδεχόμενη βροχόπτωση. Η θερμοκρασία του νερού υπολογιζόταν με τη χρήση ψηφιακού θερμομέτρου χειρός, ενώ η θερμοκρασία της ατμόσφαιρας και η βροχόπτωση καταγραφόταν βάσει των δεδομένων του μετεωρολογικού σταθμού Sant' Agata Bolognese, σε απόσταση 1,7 Km από την περιοχή μελέτης.



Εικόνα 4.3. Μεταχείριση λεκάνης απορροής ομβρίων υδάτων με το γαλάκτωμα αιθερίου ελαίου ρίγανης.



Εικόνα 4.4. Καταμέτρηση προνυμφών και νυμφών κουνουπιών σε λεκάνη απορροής ομβρίων υδάτων.

4.2.9. Στατιστική Επεξεργασία

Τα δεδομένα της θνησιμότητας των προνυμφών των κουνουπιών του υπό μελέτη είδους, *Ae. albopictus*, και του μη στοχευμένου είδους, *M. albidus*, στις 24 ώρες για κάθε δόση αιθερίου ελαίου ρίγανης ή καρβακρόλης, δηλαδή η συνολική θνησιμότητα για κάθε δοκιμαζόμενη συγκέντρωση στο υδατικό διάλυμα (δόση) υπέστησαν επεξεργασία με Probit ανάλυση, με τη χρήση του λογισμικού POLO-PC (LeOra Software POLO-PC, Berkeley, CA, U.S.A.). Με την Probit ανάλυση η σιγμοειδής καμπύλη της θνησιμότητας μετατρέπεται σε ευθεία μετά από μετατροπή των ποσοστών θνησιμότητας σε Probit μονάδες και των δόσεων σε \log_{10} . Από την Probit ανάλυση υπολογίστηκαν οι τιμές των LC_{50} (Lethal Concentration₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση στην οποία θανατώνεται το 50% του πληθυσμού) και LC_{90} (Lethal Concentration₉₀, η συγκέντρωση στην οποία θανατώνεται το 90% του πληθυσμού), τα όρια

εμπιστοσύνης (Confidential Limits, CL) για κάθε τιμή LC₅₀ ή LC₉₀ για επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$, καθώς επίσης και οι κλίσεις των ευθειών (slopes) (Finney 1971). Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου SPSS 21.0.

Τα δεδομένα της απωθητικής δράσης στα τέλεια κουνούπια (αριθμός προσγειώσεων κουνουπιών), στις εργαστηριακές βιοδοκιμές, αναλύθηκαν με το μη-παραμετρικό τεστ των Kruskal-Wallis (Sokal and Rohlf, 1995). Εφόσον διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές ($P<0,05$) για επίπεδο σημαντικότητας $\alpha= 0,05$, πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις ανά 2 με το τεστ *U* των Mann-Whitney (Sokal and Rohlf, 1995). Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου SPSS version 21.

Η απωθητική δράση του παρασκευάσματος του αιθερίου ελαίου της ρίγανης στις δοκιμές πεδίου υπολογίστηκε βάσει της σχέσης των Mulla et al. (1971) που λαμβάνει υπ' όψιν τις φυσικές μεταβολές στους πληθυσμούς των κουνουπιών τόσο στις περιοχές όπου εφαρμόστηκε το υπό μελέτη αιθέριο έλαιο (περιοχή A), όσο και στις περιοχές μάρτυρα (περιοχή B):

$$\%R = 1 - [(C1 \times T2) / (T1 \times C2)]$$

Όπου:

$\%R$ = η % απωθητικότητα

C1 = ο αριθμός των θηλυκών κουνουπιών που συλλέχθηκαν στην περιοχή μάρτυρα (περιοχή B) προ των εφαρμογών

C2 = ο αριθμός των θηλυκών κουνουπιών που συλλέχθηκαν στην περιοχή μάρτυρα (περιοχή B) μετά τις εφαρμογές

T1 = η μέση πυκνότητα των θηλυκών κουνουπιών που συλλέχθηκαν στην πειραματική περιοχή (περιοχή A) προ των εφαρμογών

T2 = η μέση πυκνότητα των θηλυκών κουνουπιών που συλλέχθηκαν στην πειραματική περιοχή (περιοχή A) μετά τις εφαρμογές

Για τον υπολογισμό της προνυμφοκτόνου και απωθητικής δράσης του παρασκευάσματος του αιθερίου ελαίου ρίγανης στις λεκάνες απορροής ομβρίων υδάτων, η μέση πυκνότητα των προνυμφών αναλύθηκε με ANOVA, ενώ για την ανίχνευση των διαφορών ανά ζεύγος χρησιμοποιήθηκε το τεστ Duncan.

4.3. Αποτελέσματα – Συζήτηση

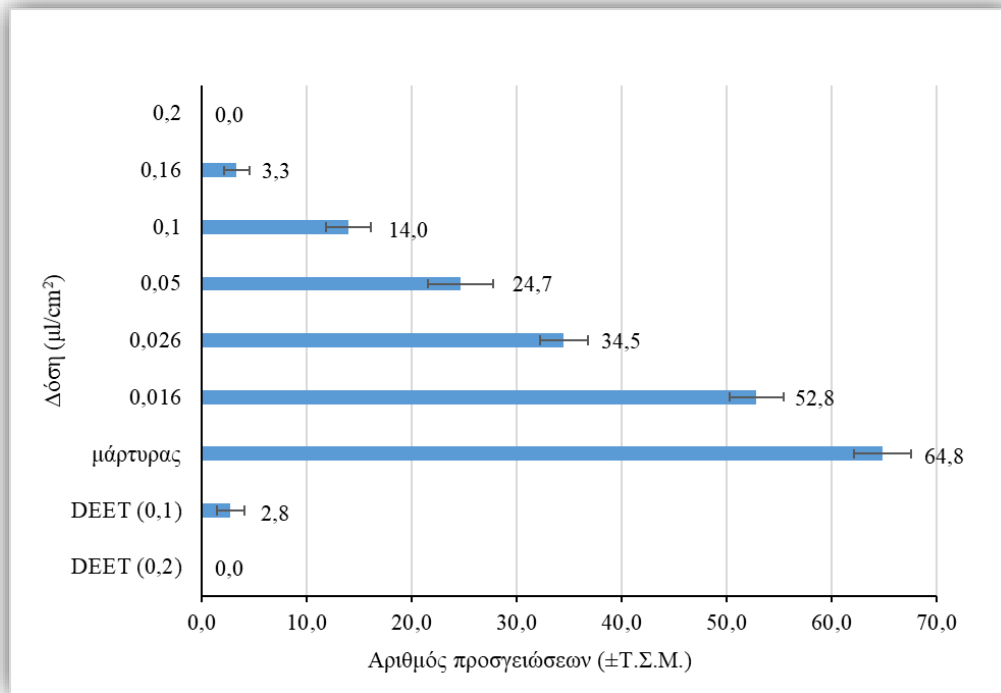
4.3.1. Χημική σύσταση του αιθερίου ελαίου της ρίγανης

Η ελληνική ρίγανη (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) χαρακτηρίζεται ως «υψηλής ποιότητας», εξαιτίας των υψηλών συγκεντρώσεων καρβακρόλης που περιέχει (Fleisher and Snee, 1982). Λόγω της μεγάλης οικονομικής σημασίας της ρίγανης σε παγκόσμιο επίπεδο, βρίσκεται σε εξέλιξη η ανάπτυξη ποικιλιών ελληνικής ρίγανης με κύριο κριτήριο την παραγωγή αιθερίων ελαίων υψηλής ποιότητας (υψηλή περιεκτικότητα σε καρβακρόλη) και απόδοσης (Sarrou et al., 2017). Με βάση τα αποτελέσματα της χημικής ανάλυσης, το αιθέριο έλαιο ρίγανης που επιλέχθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων πεδίου περιέχει καρβακρόλη σε ποσοστό 88,7%. Άλλα συστατικά είναι το π-κυμένιο (3%) και η θυμόλη (2,4%), ενώ τα υπόλοιπα ήταν σε ποσοστά <1%. Τα αναλυτικά αποτελέσματα της ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης του αιθερίου ελαίου ρίγανης παρατίθενται στο **Παράρτημα**.

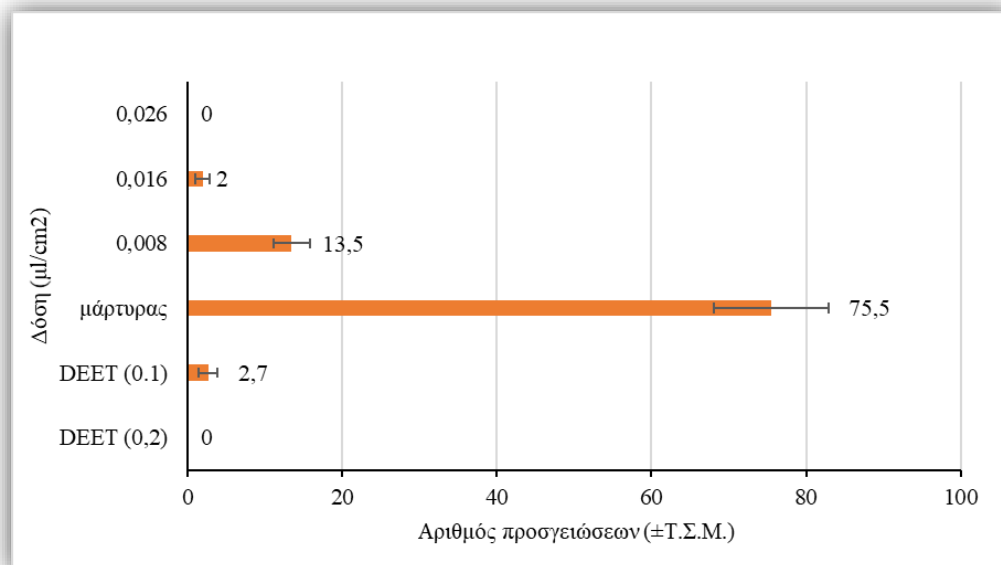
4.3.2. Αύξηση κλίμακος βιοδοκιμών

4.3.2.1. Μελέτη δόσης-απόκρισης

Τα αποτελέσματα της απωθητικής δράσης των διαφορετικών δόσεων του αιθερίου ελαίου ρίγανης και της καρβακρόλης στα ακμαία *Ae. albopictus* παρουσιάζονται στα **Διαγράμματα 4.3.1** και **4.3.2**, αντίστοιχα. Στην υψηλή δόση (0,2 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$) η απωθητική δράση του αιθερίου ελαίου ρίγανης ήταν παρόμοια με αυτή του DEET, ενώ στη χαμηλή δόση (0,1 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$) η δράση ήταν μέτρια (>20 προσγειώσεις). Αντίθετα, η καρβακρόλη εμφάνισε 100% απωθητικότητα (0 προσγειώσεις) σε δόση σχεδόν 10 φορές χαμηλότερη από τη δόση στην οποία το DEET εμφανίζει αντίστοιχη απωθητικότητα (0,026 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες σχετικά με την υψηλή προστασία που παρέχει η καρβακρόλη εναντίον του *Ae. albopictus*, σε δόσεις πέντε φορές χαμηλότερες του DEET (Giatropoulos et al., 2018), αλλά και εναντίον του *An. gambiae* (Kröber et al., 2018).



Διάγραμμα 4.3.1. Απωθητική δράση αιθερίου ελαίου ρίγανης (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*), εκφρασμένη ως ο μέσος αριθμός προσγειώσεων (±T.Σ.Μ.) του *Ae. albopictus* στο ανθρώπινο δέρμα για διάστημα 5 λεπτών. Το DCM χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας και το DEET ως θετικός μάρτυρας σε δύο δόσεις (0,1 και 0,2 μL/cm²).



Διάγραμμα 4.3.2. Απωθητική δράση της καρβακρόλης, εκφρασμένη ως ο μέσος αριθμός προσγειώσεων (±T.Σ.Μ.) του *Ae. albopictus* στο ανθρώπινο δέρμα για διάστημα 5 λεπτών. Το DCM χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας και το DEET ως θετικός μάρτυρας σε δύο δόσεις (0,1 και 0,2 μL/cm²).

Τα αντίστοιχα αποτελέσματα της προνυμφοκτόνου δράσης των υπό μελέτη ουσιών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4.3.1**. Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης εμφάνισε μέση τιμή LC₅₀ στα 30,1 (27,4–32,7) mg/L και LC₉₀ στα 58,74 (51,60–70,53) mg/L. Οι μέσες τιμές LC₅₀ και LC₉₀ για την καθαρή καρβακρόλη υπολογίστηκαν στα 13,1 (11,1–15,2) mg/L και 31,08 (25,29–43,15) mg/L, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με αυτά πρόσφατης μελέτης, όπου αξιολογήθηκε η προνυμφοκτόνος δράση του αιθερίου ελαίου της ρίγανης (*Origanum vulgare*) και του κύριου συστατικού της, καρβακρόλη, ενάντια στο *Ae. albopictus* (Giatropoulos et al., 2018).

Πίνακας 4.3.1. LC₅₀ και LC₉₀ τιμές για το αιθέριο έλαιο ρίγανης (A.E.P.) και το κύριο συστατικό του, καρβακρόλη, εναντίον προνυμφών 3^{ης}–4^{ης} ηλικίας *Ae. albopictus*.

| Δραστικά συστατικά | Κλίση ευθείας (±T.Σ.) | LC ₅₀ (95% O.E.) ^a | LC ₉₀ (95% O.E.) ^a | x ^{2B} | B.E. |
|--------------------|--------------------------|---|---|---------------------|------|
| A.E.P. | 4,405 (±0,460) | 30,1 (27,4–32,7) | 58,7 (51,6–70,5) | 10,911 | 13 |
| Καρβακρόλη | 3,426 (±0,332) | 13,1 (11,1–15,2) | 31,1 (25,3–43,2) | 29,346 ^b | 16 |

^a Οι τιμές LC εκφράζονται σε mg/L και υπάρχει μεταξύ τους στατιστικώς σημαντική διαφορά όταν τα όρια εμπιστοσύνης (O.E.) για επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$ (95%) δεν επικαλύπτονται.

^b Από τη στιγμή που η καλή προσαρμογή των δοκιμών είναι σημαντική ($P < 0,05$), ένας ετερογενής παράγοντας χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των ορίων εμπιστοσύνης (O.E.).

4.3.2.2. Τοξικότητα σε οργανισμούς μη-στόχους

Η τοξικότητα του αιθερίου ελαίου ρίγανης και της καρβακρόλης μελετήθηκε και ενάντια στο μη στοχευμένο υδρόβιο είδος *Macrocyclus albidus*. Το είδος αυτό είναι ευρέως διαδεδομένο στα φυσικά υδάτινα συστήματα της Ευρώπης και έχει πρόσφατα προταθεί ως παράγοντας βιολογικού ελέγχου των κουνουπιών, και συγκεκριμένα του *Ae. albopictus*, σε τεχνητές εστίες αναπαραγωγής (Mulla et al., 1971; Baldacchino et al., 2015). Με βάση τα σχετικά αποτελέσματα των δοκιμών (**Πίνακας 4.3.2**), τα τέλεια κοπήποδα *M. albidus* εμφάνισαν υψηλή ευαισθησία και στα δύο υπό μελέτη προϊόντα (αιθέριο έλαιο ρίγανης και καρβακρόλη), παρουσιάζοντας χαμηλότερες τιμές LC₉₀ σε σύγκριση με αυτές που υπολογίστηκαν για το *Ae. albopictus*. Συγκεκριμένα, το αιθέριο έλαιο της ρίγανης εμφάνισε μέση τιμή LC₉₀ στα 12,8 (8,0–38,1) mg/L και η καρβακρόλη στα 13,3 (7,5–87,2) mg/L. Τα αποτελέσματα αυτά, σαφώς υποδεικνύουν ότι η χρήση των δύο αυτών προϊόντων ως προνυμφοκτόνα δεν είναι εφικτή όταν βρίσκονται σε εφαρμογή προγράμματα βιολογικού ελέγχου με χρήση θηρευτών.

Πίνακας 4.3.2. LC₅₀ και LC₉₀ τιμές για το αιθέριο έλαιο ρίγανης (A.E.P.) και το κύριο συστατικό του, καρβακρόλη, εναντίον του *M. albidus*.

| Δραστικά Προϊόντα | Κλίση ευθείας (±T.Σ.) | LC ₅₀ (95% O.E.) ^a | LC ₉₀ (95% O.E.) ^a | x ^{2B} | B.E. |
|-------------------|--------------------------|---|---|-----------------|------|
| A.E.P. | 3,386 (±0,351) | 5,5 (3,5–8,6) | 12,8 (8,0–38,1) | 74,620 | 10 |
| Καρβακρόλη | 3,337 (±0,349) | 5,3 (3,1–11,6) | 13,3 (7,5–87,2) | 44,065 | 10 |

^a Οι τιμές LC εκφράζονται σε mg/L και υπάρχει μεταξύ τους στατιστικώς σημαντική διαφορά όταν τα όρια εμπιστοσύνης (O.E.) για επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$ (95%) δεν επικαλύπτονται.

4.3.3. Δοκιμές Πεδίου

4.3.3.1. Αποθητικά Εξωτερικού Χώρου

Η αποτελεσματικότητα του αιθερίου ελαίου ρίγανης στη μορφή γαλακτώματος αξιολογήθηκε ως αποθητικό εξωτερικού χώρου σε αστική περιοχή με υψηλή βλάστηση, όπου δραστηριοποιούνται υψηλής πυκνότητας πληθυσμοί *Ae. albopictus*. Για το σκοπό αυτό, μετρήθηκε η ικανότητα του παρασκευάσματος να απωθεί τα θηλυκά *Ae. albopictus* στην πειραματική περιοχή τις ημέρες 1, 2 και 3 μετά την εφαρμογή. Κατά τη διεξαγωγή του πειράματος δεν παρατηρήθηκαν επιπτώσεις στη βλάστηση της περιοχής.

Η αποθητική δράση που υπολογίστηκε ακριβώς μετά την εφαρμογή (ημέρα 0) ήταν πολύ χαμηλή και αντιστοιχούσε στην κατά 32,5% μείωση του αριθμού των θηλυκών που συλλέχθηκαν στην περιοχή του πειράματος σε σύγκριση με την περιοχή μάρτυρα. Αυτή αυξήθηκε σε 86,4 % και 81,25 % για τις ημέρες 1 και 2 μετά την εφαρμογή, αντίστοιχα. Την ημέρα 3 μετά την εφαρμογή, η μείωση των θηλυκών κουνουπιών υπολογίστηκε στο 69,67%. Τα συνολικά αποτελέσματα της δράσης του παρασκευάσματος αιθερίου ελαίου ως αποθητικού χώρων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4.3.3**. Η χρήση αποθητικών εξωτερικού χώρου για την προστασία συγκεκριμένων περιοχών από εισβάλλοντα είδη κουνουπιών έχει προταθεί πρόσφατα ως στρατηγική ελέγχου των κουνουπιών (Alten et al., 2003; Dame et al., 2014). Στο πλαίσιο, ωστόσο, της ασφαλούς περιβαλλοντικής διαχείρισης, η χρήση αποθητικών εξωτερικού χώρου γίνεται αποδεκτή μόνο στις περιπτώσεις που εφαρμόζονται προϊόντα με αντίστοιχο περιβαλλοντικό προφίλ, όπως αυτό που παρουσιάζουν τα αιθέρια έλαια.

Πίνακας 4.3.3. Αριθμός θηλυκών *Ae. albopictus* που συλλέχθηκαν με Σ.Π.Α. (Συλλογές Προσγειώσεων στον Άνθρωπο) κατά τη διάρκεια των βιοδοκιμών πεδίου.

| Ημέρα | Περιοχή | Τμχ. | Μέσος αριθμός κουνουπιών | Τ.Α. | Αποθητική δράση (%)* |
|-------------------------------|---------|------|--------------------------|------|----------------------|
| προ-πειραματική | A | 2 | 20,00 | 7,07 | |
| | B | 2 | 3,50 | 3,54 | |
| ημέρα 0 (ημέρα πειράματος) | A | 2 | 13,50 | 3,54 | 32,5 |
| | B | 2 | 4,50 | 2,12 | |
| ημέρα 1 μετά-πειραματική | A | 2 | 10,50 | 2,12 | 86,39 |
| | B | 2 | 13,50 | 2,12 | |
| ημέρα 2 μετά-πειραματική | A | 2 | 7,50 | 2,12 | 81,25 |
| | B | 2 | 7,00 | 2,83 | |
| ημέρα 3 μετά-πειραματική | A | 2 | 13,00 | 4,24 | 69,67 |
| | B | 2 | 7,50 | 0,71 | |
| Συνολικά | | 2 | 10,05 | 3,04 | |

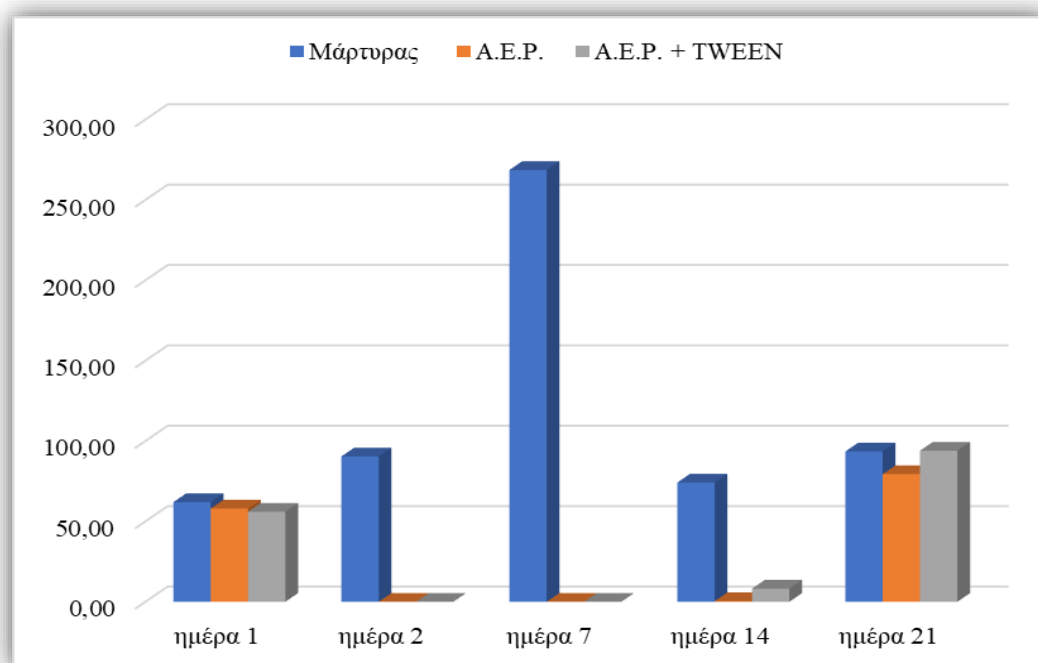
A: περιοχή πειράματος (εφαρμογή παρασκευάσματος αιθερίου ελαίου ρίγανης)

B: περιοχή μάρτυρας (εφαρμογή υδατικού διαλύματος 5% TWEEN® 20)

* Η % αποθητική δράση υπολογίστηκε βάσει της σχέσης Mulla

4.3.3.2. Προνυμφοκτόνος και αποθητική δράση σε λεκάνες απορροής ομβρίων υδάτων

Μία επιπλέον δοκιμή πεδίου υλοποιήθηκε με σκοπό να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα του αιθερίου ελαίου ρίγανης τόσο ως προνυμφοκτόνο, όσο και ως αποθητικό-ανασταλτικό ωοτοκίας των κουνουπιών. Η δοκιμή πεδίου έλαβε χώρα κατά την περίοδο από 13 Ιουλίου έως 3 Αυγούστου 2017 σε λεκάνες απορροής ομβρίων υδάτων, οι οποίες αποτελούν μία από τις πιο κοινές εστίες αναπαραγωγής των κουνουπιών και υποβάλλονται συχνά σε προνυμφικό έλεγχο. Η εφαρμογή του υπό μελέτη αιθερίου ελαίου στις αναπαραγωγικές εστίες μπορεί να παρουσιάσει ταυτόχρονα διττή δράση: 1) απ' ευθείας τοξικότητα του προϊόντος στις υπό ανάπτυξη προνύμφες και 2) απόθεση των θηλυκών κουνουπιών που βρίσκονται σε ωοτοκία. Τα αποτελέσματα των δύο αυτών δράσεων δεν μπορούν να διαχωριστούν στο πλαίσιο του παρόντος πειράματος και παρουσιάζονται συνολικά στο **Διάγραμμα 4.3.3**. Κατά τη διάρκεια υλοποίησης των πειραμάτων πεδίου, η θερμοκρασία του νερού στις λεκάνες απορροής μετρήθηκε στους $30,1 \pm 1,4^\circ\text{C}$ (ελάχιστη 27°C και μέγιστη 33°C), ενώ ένα περιστατικό βροχόπτωσης (15,2mm) σημειώθηκε στον μετεωρολογικό σταθμό Sant' Agata Bolognese, σε απόσταση 1,7 Km από την περιοχή μελέτης, κατά τη 10^η ημέρα της δοκιμής.



Διάγραμμα 4.3.3. Διακύμανση του αριθμού προνυμφών (L₁-L₂-L₃-L₄) και νυμφών *Ae. albopictus* και *Cx. pipiens* την ημέρα 1 προ των εφαρμογών και κατά τη διάρκεια των 21 ημερών μετά την εφαρμογή των υπό μελέτη προϊόντων.

Στις λεκάνες απορροής μελετήθηκε, αφ' ενός, η δράση του καθαρού αιθερίου ελαίου ρίγανης και, αφ' ετέρου, η δράση γαλακτώματος αιθερίου ελαίου (66,6% νερό, 16,7% αιθέριο έλαιο ρίγανης και 16,7% TWEEN® 20). Η θνησιμότητα των προνυμφών (*Cx. pipiens* and *Ae. albopictus*) ήσαν 100% τις ημέρες 2 και 7 μετά την εφαρμογή και για τα δύο υπό μελέτη προϊόντα (**Πίνακας 4.3.4**). Την ημέρα 14 μετά των εφαρμογών η παρατηρούμενη προνυμφική θνησιμότητα παρέμενε στο 100% έναντι του είδους *Cx. pipiens* στις εστίες όπου εφαρμόστηκε το καθαρό αιθέριο έλαιο, ενώ μικρός αριθμός προνυμφών αυτού του είδους καταγράφηκε στις εστίες όπου εφαρμόστηκε το αντίστοιχο γαλάκτωμα. Όσον αφορά το *Ae. albopictus*, την ίδια ημέρα (ημέρα 14 μετά εφαρμογών) καταγράφηκε μικρός αριθμός ζωντανών προνυμφών τόσο στις λεκάνες όπου εφαρμόστηκε καθαρό αιθέριο έλαιο, όσο και σε αυτές που εφαρμόστηκε το αντίστοιχο γαλάκτωμα, ενώ τα ποσοστά θνησιμότητας εξακολουθούσαν να είναι υψηλά. Τέλος, την 21^η ημέρα μετά την εφαρμογή δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στον αριθμό των προνυμφών μεταξύ των μεταχειρισμένων και αμεταχειριστων (μάρτυρες) λεκανών απορροής.

Η δυναμική που παρουσιάζουν τα αποτελέσματα των μετρήσεων οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η απωθητική δράση του υπό μελέτη αιθερίου ελαίου στα φωτόκα θηλυκά κουνούπια έχει διάρκεια περίπου δύο εβδομάδες. Όμως θα πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν ότι κατά τη 10^η ημέρα εφαρμογής τους παρατηρήθηκε ισχυρή βροχόπτωση στην περιοχή, η οποία ενδεχομένως να επηρέασε την αποτελεσματικότητά τους. Επίσης, η ειδική μελέτη της δράσης των προϊόντων έναντι των δύο διαφορετικών ειδών (*Cx. pipiens* and *Ae. albopictus*) έδειξε ότι παρουσιάζουν ελαφρώς μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα κατά του *Cx. pipiens*. Όσον αφορά την προσθήκη γαλακτοματοποιητή (TWEEN® 20), αυτή δεν φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά τη δράση του αιθερίου ελαίου. Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπ' όψη ότι οι σχετικοί ψεκασμοί που διενεργούνται στην Περιφέρεια αυτή με τη χρήση συνθετικών εντομοκτόνων επαναλαμβάνονται κάθε τρεις εβδομάδες (μέγιστη διάρκεια δράσης συνθετικού εντομοκτόνου), το προϊόν που αναπτύχθηκε στο πλαίσιο διενέργειας της διατριβής είναι δυνατόν να αποτελέσει ένα πολλά υποσχόμενο εναλλακτικό φυσικό εντομοκτόνο. Βέβαια, για να πιστοποιηθεί το εύρημα, είναι απαραίτητη η διενέργεια επιπλέον δοκιμών πεδίου σε ακόμα μεγαλύτερες και αντιπροσωπευτικότερες περιοχές.

Πίνακας 4.3.4. Μέσος αριθμός προνυμφών (L₁-L₂-L₃-L₄) και νυμφών *Ae. albopictus* και *Cx. pipiens* που συλλέχθηκαν με δίχτυ ενυδρείου ανά λεκάνη απορροής ομβρίων υδάτων.

| Ημέρα | Προϊόν* | Αρ. | Cx. Pipiens | | | Ae. Albopictus | | | Σύνολο | | |
|----------------------------|----------------|-----|---------------|--------|-------------|----------------|-------|-------------|---------------|--------|-------------|
| | | | Μέσος Αριθμός | T.A. | Τέστ Duncan | Μέσος Αριθμός | T.A. | Τέστ Duncan | Μέσος Αριθμός | T.A. | Τέστ Duncan |
| Ημέρα 1 προ-εφαρμογών | Μάρτυρας | 5 | 2,00 | 4,47 | ns | 60,00 | 62,05 | ns | 62,00 | 63,80 | ns |
| | A.E.P. | 5 | 4,00 | 6,52 | | 54,00 | 25,10 | | 58,00 | 28,42 | |
| | A.E.P. + TWEEN | 5 | 0,00 | 0,00 | | 56,00 | 33,62 | | 56,00 | 33,62 | |
| Ημέρα 2 μετά-εφαρμογών | Μάρτυρας | 5 | 34,00 | 38,47 | α | 56,40 | 50,67 | α | 90,40 | 66,55 | α |
| | A.E.P. | 5 | 0,00 | 0,00 | β | 0,00 | 0,00 | β | 0,00 | 0,00 | β |
| | A.E.P. + TWEEN | 5 | 0,00 | 0,00 | β | 0,00 | 0,00 | β | 0,00 | 0,00 | β |
| Ημέρα 7 μετά-εφαρμογών | Μάρτυρας | 5 | 240,00 | 132,71 | α | 28,60 | 46,15 | α | 268,60 | 116,22 | α |
| | A.E.P. | 5 | 0,00 | 0,00 | β | 0,00 | 0,00 | β | 0,00 | 0,00 | β |
| | A.E.P. + TWEEN | 5 | 0,00 | 0,00 | β | 0,00 | 0,00 | β | 0,00 | 0,00 | β |
| Ημέρα 14 μετά-εφαρμογών | Μάρτυρας | 5 | 51,60 | 23,46 | α | 22,60 | 21,42 | α | 74,20 | 32,03 | α |
| | A.E.P. | 5 | 0,00 | 0,00 | β | 0,40 | 0,89 | β | 0,40 | 0,89 | β |
| | A.E.P. + TWEEN | 5 | 2,00 | 4,47 | β | 6,20 | 8,01 | αβ | 8,20 | 8,26 | β |
| Ημέρα 21 μετά-εφαρμογών | Μάρτυρας | 4 | 83,75 | 68,84 | ns | 9,75 | 16,94 | ns | 93,50 | 59,60 | ns |
| | A.E.P. | 5 | 64,40 | 104,52 | | 15,00 | 17,32 | | 79,40 | 118,99 | |
| | A.E.P. + TWEEN | 5 | 71,60 | 42,66 | | 22,40 | 19,77 | | 94,00 | 50,99 | |
| Όλες οι ομάδες | | 74 | 36,26 | 76,61 | | 22,26 | 34,18 | | 58,51 | 84,10 | |

*Λεκάνες απορροής όπου εφαρμόστηκαν: A.E.P.=Αιθέριο Έλαιο Ρίγανης, A.E.P.+TWEEN=Αιθέριο Έλαιο Ρίγανης+TWEEN@20, Μάρτυρας=αμεταχείριστες

4.4. Συμπεράσματα

Το τελευταίο αυτό τμήμα της διατριβής στόχευε στην ανάπτυξη μιας απλουστευμένης διαδικασίας αξιοποίησης των αποτελεσμάτων της βιο-διερεύνησης σε βιοκτόνα προϊόντα. Ως αντικείμενα της βιο-διερεύνησης τέθηκαν τα φυτά που προέρχονται από τις τρεις ομάδες της ελληνικής βιοποικιλότητας που μελετήθηκαν στο πρώτο μέρος της διατριβής, εστιάζοντας στην ομάδα των αρωματικών – αρτυματικών φυτών. Αντικείμενο της αξιοποίησης αποτέλεσε ο έλεγχος του χωροκατακτητικού είδους *Ae. albopictus*. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στα ενδιάμεσα στάδια μεταξύ των εργαστηριακών βιοδοκιμών και των πειραμάτων πεδίου, που αποτελούν το τελευταίο κρίσιμο στάδιο για την ανάπτυξη βιοκτόνων προϊόντων, μέσω των οποίων επιχειρήθηκε να αντιμετωπιστούν τρεις βασικές προκλήσεις: 1) η εξεύρεση ενός ευρέως διαθέσιμου-καλλιεργούμενου taxon, ικανού να παράγει σημαντικές ποσότητες Π.Κ.Α.Ε., τα οποία αναδείχθηκαν από τα αποτελέσματα της βιο-διερεύνησης ως η πλέον πρόσφορη προς περαιτέρω ανάπτυξη ομάδα αιθερίων ελαίων, 2) ο προσδιορισμός της βέλτιστης συγκέντρωσης, ώστε να επιτευχθεί μέγιστη αποτελεσματικότητα με μηδαμινές περιβαλλοντικές επιπτώσεις και 3) η ανάπτυξη ενός παρασκευάσματος του επιλεγμένου αιθερίου ελαίου που να διευκολύνει τις εφαρμογές στο πεδίο.

Το Π.Κ.Α.Ε. της εμπορικής ποικιλίας *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* εμφάνισε ισχυρή απωθητική ($0,2 \mu\text{L}/\text{cm}^2$) και προνυμφοκτόνο δράση (LC_{90} : $58,747 \text{ mg/L}$) έναντι του *Ae. albopictus*, αλλά και υψηλή τοξικότητα στον μη στοχευμένο οργανισμό *Macrocyclops albidus* (LC_{90} : $12,806 \text{ mg/L}$). Έτσι, η τελευταία τιμή καθόρισε τη συγκέντρωση που εφαρμόστηκε στα πειράματα πεδίου (λεκάνες απορροής ομβρίων υδάτων) για τον προσδιορισμό της προνυμφοκτόνου δράσης ενάντια στο *Ae. albopictus*, αλλά και το *Cx. pipiens*. Βάσει των αποτελεσμάτων των δοκιμών πεδίου, τα Π.Κ.Α.Ε. ρίγανης, σε κατάλληλο παρασκεύασμα με γαλακτοματοποιητή, μπορούν να θεωρηθούν ως πολλά υποσχόμενοι παράγοντες για τον έλεγχο του *Ae. albopictus* τόσο ως απωθητικά, όσο και ως προνυμφοκτόνα. Επιπλέον, η κλιμακωτή πορεία ανάπτυξης βιοκτόνου που παρουσιάζεται στο παρόν κεφάλαιο, αντιμετωπίζει αποτελεσματικά τις προαναφερθείσες προκλήσεις και μπορεί να αποτελέσει ένα μεθοδολογικό πρότυπο για την αξιοποίηση των αιθερίων ελαίων ως εναλλακτικά φυσικά βιοκτόνα.

Βιβλιογραφία

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

- Abebe, A., Natarajan, P. and Getahun, A. (2018). Efficacy of tilapia, *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zilli* for the control of mosquito larvae around Fincha Valley, Oromia region, Ethiopia. *International Journal of Mosquito Research*, 5(3), Part A.
- Adams, R. P. (1997). Comparisons of the Leaf Oils of *Juniperus drupacea* Labill. from Greece, Turkey and the Crimea. *Journal of Essential Oil Research*, 9(5), 541–544.
- Adhami, J. and Murati, N. (1987). Prani e mushkonjes *Aedes albopictus* ne Shqiperi. [Presence of *Aedes albopictus* in Albania]. *Revista Mjekesore*, 1, 13-16.
- Adhami, J. and Reiter, P. (1998). Introduction and establishment of *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae) in Albania. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 14(3), 340-343.
- Ahmad, M. M., Salim-Ur-Rehman, Iqbal, Z., Anjum, F. M. and Sultan, J. I. (2006). Genetic variability to essential oil composition in four citrus fruit species. *Pakistan Journal of Botany*, 38(2), 319–324.
- Ali, A., Demirci, B., Kiyan, H. T., Bernier, U. R., Tsikolia, M., Wedge, D. E. and Tabanca, N. (2013). Biting Deterrence, Repellency, and Larvicidal Activity of *Ruta chalepensis* (Sapindales: Rutaceae) Essential Oil and Its Major Individual Constituents Against Mosquitoes. *Journal of Medical Entomology*, 50(6), 1267–1274.
- Ali, A., Tabanca, N., Kurkcuoglu, M., Duran, A., Blythe, E. K., Khan, I. A. and Can Baser, K. H. (2014). Chemical Composition, Larvicidal, and Biting Deterrent Activity of Essential Oils of Two Subspecies of *Tanacetum argenteum* (Asterales: Asteraceae) and Individual Constituents Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 51(4), 824–830.
- Almeida, A.P.G., Gonçalves, Y.M., Novo, M.T., Sousa, C.A., Melim, M. and Gracio, A.J.S. (2007). Vector monitoring of *Aedes aegypti* in the Autonomous Region of Madeira, Portugal. *Euro Surveillance*, 12(46), 3311.
- Al-Mekhlafi, F. A. (2018). Larvicidal, ovicidal activities and histopathological alterations induced by *Carum copticum* (Apiaceae) extract against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(1), 52–56.
- Alphey, L. (2014). Genetic control of mosquitoes. *Annual Review of Entomology*, 59(1), 205-224.
- Alphey, L., McKemey, A., Nimmo, D., Neira Oviedo, M., Lacroix, R., Matzen, K. and Beech, C. (2013). Genetic control of *Aedes* mosquitoes. *Pathogens and Global Health*, 107(4), 170–179.

- Alvarez Costa, A., Naspi, C. V., Lucia, A., and Masuh, H. M. (2017). Repellent and Larvicidal Activity of the Essential Oil From *Eucalyptus nitens* Against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 54(3), 670–676.
- Amer, A. and Mehlhorn, H. (2006a). Repellency effects of forty-one essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* mosquitoes. *Parasitology Research*, 99(4), 478–490.
- Amer, A. and Mehlhorn, H. (2006b). Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). *Parasitology Research*, 99(4), 466–472.
- Angelini, R., Finarelli, A., Angelini, P., Po, C., Petropulacos, K., Macini, P., Fiorentini, C., Fortuna, C., Venturi, G., Romi, R., Majori, G., Nicoletti, L., Rezza, G. and Cassone, A. (2007). An outbreak of Chikungunya fever in the province of Ravenna, Italy. *Eurosurveillance*, 12(7-9), 281.
- Ansari, M.A. and Razdan, R.K. (1994). Repellent action of *Cymbopogon martinii martinii* Stapf var. *sofia* oil against mosquitoes. *Indian Journal of Malariology*, 31, 95–102.
- Aranda, C., Eritja, R. and Roiz, D. (2006). First record and establishment of the mosquito *Aedes albopictus* in Spain. *Medical and Veterinary Entomology*, 20, 150-152.
- Arce, A. and Soto, A. (2008). Citrus Essential Oils: Extraction and Deterpenation. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*, 2(1), 1–9.
- Aşkun, T., Başer, K.H.C., Tumen, G. and Kurkcuoğlu, M. (2010). Characterization of essential oils of some *Salvia* species and their antimycobacterial activities. *Turkish Journal of Biology*, 34, 89-95.
- Auysawasdi, N., Chuntranuluck, S., Phasomkusolsil, S. and Keeratinijakal, V. (2015). Improving the effectiveness of three essential oils against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison). *Parasitology Research*, 115(1), 99–106.
- Aygun, D., Doganay, Z., Altintop, L., Guven, H., Onar, M., Deniz, T. and Sunter, T. (2002). Serum acetylcholinesterase and prognosis of acute organophosphate poisoning. *Journal of Toxicology Clinical Toxicology*, 40, 903-910.
- Azeem, M., Zaman, T., Tahir, M., Haris, A., Iqbal, Z., Binyameen, M. and Mozūraitis, R. (2019). Chemical composition and repellent activity of native plants essential oils against dengue mosquito, *Aedes aegypti*. *Industrial Crops and Products*, 140, 111609.
- Badieritakis, E., Papachristos, D., Latinopoulos, D., Stefopoulou, A., Kolimenakis, A., Bithas, K., Patsoula, E., Beleri, S., Maselou D., Balatsos, G. and Michaelakis, A. (2017). *Aedes albopictus* (Skuse, 1895) (Diptera: Culicidae) in Greece: 13 years of living with the Asian tiger mosquito. *Parasitology Research*, 117(2), 453–460.
- Bakkali F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A Review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-475.

- Baldacchino, F., Caputo, B., Chandre, F., Drago, A., della Torre, A., Montarsi, F. and Rizzoli, A. (2015). Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: a review. *Pest Management Science*, 71(11), 1471–1485.
- Barat Shooshtari, M. and Galandari, R. (2012). Comparative study on Repellent Effect of Extracts and Essential Oils of *Melissa officinalis*, *Rosmarinus officinalis* and *Lavandula angustifolia* Against Main Malaria Vector, *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 27(4), 606-613.
- Barat Shooshtari, M., Kashani, H.H., Heidari, S. and Ghalandari R. (2013). Comparative mosquito repellent efficacy of alcoholic extracts and essential oils of different plants against *Anopheles Stephensi*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7(6), 310–314.
- Barnard, D.R. (1999). Repellency of essential oils to mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 36, 625–629.
- Barzman, M., Bärberi, P., Birch, A. N. E., Boonekamp, P., Dachbrodt-Saaydeh, S., Graf, B., Sattin, M. (2015). Eight principles of integrated pest management. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(4), 1199–1215.
- Bauer, K. and Garbe, D. (1985). Common Fragrance and Flavor Materials. Preparation, Properties and Uses. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, p. 213.
- Bauer, K., Garbe, D., Surburg, H. (2001). Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses. Wiley-VCH, Weinheim, p. 293.
- Becker N., Petric, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M., Dahl, C. and Kaiser, A. (2010). Mosquitoes and Their Control. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Second edition, 577 pp.
- Bedini, S., Flamini, G., Ascricchi, R., Venturi, F., Ferroni, G., Bader, A. and Conti, B. (2018). Essential oils sensory quality and their bioactivity against the mosquito *Aedes albopictus*. *Scientific Reports*, 8(1).
- Bellini, R. (2001). Surveillance and prevention to stop the spread of *Aedes albopictus* in Europe. Proceedings of the 1st Balkan Conference. Malaria and Mosquito Control. 5-7 April 2001, Serres, Greece, pp. 104-106.
- Bellini, R., Balestrino, F., Medici, A., Gentile, G., Veronesi, R. and Carrieri, M. (2013). Mating Competitiveness of *Aedes albopictus* Radio-Sterilized Males in Large Enclosures Exposed to Natural Conditions. *Journal of Medical Entomology*, 50(1), 94–102.
- Benedict, M. and Robinson, A. (2003). The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. *Trends in Parasitology*, 19(8), 349-355.
- Benedict, M. (2003). The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. *Trends in Parasitology*, 19(8), 349–355.

- Benedict, M. Q., Levine, R. S., Hawley, W. A. and Lounibos, L. P. (2007). Spread of the Tiger: Global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 7(1), 76-85.
- Benelli, G. and Pavela, R. (2018a). Beyond mosquitoes—Essential oil toxicity and repellency against bloodsucking insects. *Industrial Crops and Products*, 117, 382–392.
- Benelli, G. and Pavela, R. (2018b). Repellence of essential oils and selected compounds against ticks—A systematic review. *Acta Tropica*, 179, 47–54.
- Benelli, G., Canale, A. and Conti, B. (2014). Eco-friendly control strategies against the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): repellency and toxic activity of plant essential oils and extracts. *Pharmacology On Line*, 1, 44–51.
- Benelli, G., Flamini, G., Fiore, G., Cioni, P. L. and Conti, B. (2012). Larvicidal and repellent activity of the essential oil of *Coriandrum sativum* L. (Apiaceae) fruits against the filariasis vector *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 112(3), 1155–1161.
- Benelli, G., Pavela, R., Giordani, C., Casettari, L., Curzi, G., Cappellacci, L. and Maggi, F. (2018). Acute and sub-lethal toxicity of eight essential oils of commercial interest against the filariasis mosquito *Culex quinquefasciatus* and the housefly *Musca domestica*. *Industrial Crops and Products*, 112, 668–680.
- Benelli, G., Pavela, R., Iannarelli, R., Petrelli, R., Cappellacci, L., Cianfaglione, K. and Maggi, F. (2017). Synergized mixtures of Apiaceae essential oils and related plant-borne compounds: Larvicidal effectiveness on the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* Say. *Industrial Crops and Products*, 96, 186–195.
- Berg, P. (2008). Asilomar 1975: DNA modification secured. *Nature*, 455, 290–291.
- Birkett, M. A., Hassanali, A., Hoglund, S., Pettersson, J., and Pickett, J. A. (2011). Repellent activity of catmint, *Nepeta cataria*, and iridoid nepetalactone isomers against Afro-tropical mosquitoes, ixodid ticks and red poultry mites. *Phytochemistry*, 72(1), 109–114.
- Bloomquist, J.R. (2003). Chloride channels as tools for developing selective insecticides. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 54 (4), 145-156.
- Bloomquist, J.R., Boina, D.R., Chow, E., Carlier, P.R., Reina, M. and Gonzalez-Coloma, A. (2008). Mode of action of the plant-derived silphinenes on insect and mammalian GABAA receptor/chloride channel complex. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 91 (1), 17-23.
- Bourtzis, K., Dobson, S. L., Xi, Z., Rasgon, J. L., Calvitti, M., Moreira, L. A., Gilles, J. R. L. (2014). Harnessing mosquito–*Wolbachia* symbiosis for vector and disease control. *Acta Tropica*, 132, S150–S163.
- Boussaada, O., Kamel, M. B. H., Ammar, S., Haouas, D., Mighri, Z. and Helal, A. N. (2008). Insecticidal activity of some Asteraceae plant extracts against *Tribolium confusum*. *Bulletin of Insectology*, 61, 283–289.

- Bowles, E. J. (2003). *The Chemistry of Aromatherapeutic Oils*; 3rd Edition Griffin Press.
- Breitmaier, E. (2006). *Terpenes*. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co, Morlenbach, Germany, pp 214.
- Brown, A. and Ral, R. (1971). Insecticide resistance in arthropods. World Health Organization monograph series, 38, 491.
- Brown, A.E. (2005). Mode of action of insecticides and related pest control chemicals for production agriculture, ornamentals and turf. Pesticide information leaflet, 43, 13.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – A Review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- C.D.C. (2005). Updated information regarding insect repellents. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/RepellentUpdates.htm>
- Caccioni, D. R., Guizzardi, M., Biondi, D. M., Agatino R. and Ruberto, G. (1998). Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Microbiology*, 43(1-2), 73–79.
- Campolo, O., Romeo, F. V., Algeri, G. M., Laudani, F., Malacrino, A., Timpanaro, N. and Palmeri, V. (2015). Larvicidal Effects of Four Citrus Peel Essential Oils Against the Arbovirus Vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Economic Entomology*, 109(1), 360–365.
- Carrasco, A., Perez, E., Cutillas, A.-B., Martinez-Gutierrez, R., Tomas, V. and Tudela, J. (2016). *Origanum vulgare* and *Thymbra capitata* essential oils from Spain: determination of aromatic profile and bioactivities. *Natural Products Communications*, 11, 113–120.
- Carrieri, M., Angelini, P., Venturelli, C., Maccagnani, B. and Bellini, R. (2011). *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Population Size Survey in the 2007 Chikungunya Outbreak Area in Italy. I. Characterization of Breeding Sites and Evaluation of Sampling Methodologies. *Journal of Medical Entomology*, 48(6), 1214–1225.
- Carroll, J. F., Demirci, B., Kramer, M., Bernier, U. R., Agramonte, N. M. and Baser, K. H. C. (2017). Repellency of the *Origanum onites* L. essential oil and constituents to the lone star tick and yellow fever mosquito. *Natural Product Research*, 31, 2192–2197.
- Carroll, J. F., Tabanca, N., Kramer, M., Elejalde, N. M., Wedge, D. E., Bernier, U. R., Coy, M., Becnel, J.J., Demirci, B., Başer, K.H., Zhang, J. and Zhang, S. (2011). Essential oils of *Cupressus funebris*, *Juniperus communis*, and *J. chinensis* (Cupressaceae) as repellents against ticks (Acari: Ixodidae) and mosquitoes (Diptera: Culicidae) and as toxicants against mosquitoes. *Journal of Vector Ecology*, 36(2), 258–268.
- Carroll, S. P. and Loye, J. (2006). PMD, a Registered Botanical Mosquito Repellent with Deet-Like Efficacy. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22(3), 507–514.
- Carson, C.F. and Riley, T.V. (1993). Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Letters in Applied Microbiology*, 16, 49– 55.

- Casida, J.E. (1973). *Pyrethrum, the Natural Insecticide*. Academic Press, New York.
- Cetin, H., Yanikoglu, A. and Cilek, J.E. (2011). Larvicidal activity of selected plant hydrodistillate extracts against the house mosquito, *Culex pipiens*, a West Nile virus vector. *Parasitology Research*, 108, 943–948.
- Chalchat, J. C., Ozcan, M. M., Dagdelen, A. and Akgul, A. (2007). Variability of essential oil composition of *Echinophora tenuifolia* subsp. *sibthorpiana* tutin by harvest location and year and oil storage. *Chemistry of Natural Compounds*, 43(2), 225–227.
- Chang, K.S., Tak, J.H., Kim, S.I., Lee, W.J. and Ahn, Y.J. (2006). Repellency of *Cinnamomum cassia* bark compounds and cream containing cassia oil to *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) under laboratory and indoor conditions. *Pest Management Science*, 62, 1032–1038.
- Chantraine, J. M., Laurent, D., Ballivian, C., Saavedra, G., Ibanez, R. and Vilaseca, L. A. (1998). Insecticidal activity of essential oils on *Ae. Aegypti* larvae. *Phytotherapy Research*, 12, 350–354
- Cheah, S.-X., Tay, J.-W., Chan, L.-K. and Jaal, Z. (2013). Larvicidal, oviposition, and ovicidal effects of *Artemisia annua* (Asterales: Asteraceae) against *Aedes aegypti*, *Anopheles sinensis* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 112(9), 3275–3282.
- Chellappandian, M., Senthil-Nathan, S., Vasantha Srinivasan, P., Ponsankar, A., Thanigaivel, A. and Edwin, E. (2018). Botanical essential oils as mosquitocides and repellents against dengue vectors of human disease: phytochemical review. *Environment International*, 113, 214–230.
- Chellappandian, M., Thanigaivel, A., Vasantha-Srinivasan, P., Edwin, E.-S., Ponsankar, A., Selin-Rani, S. and Benelli, G. (2017). Toxicological effects of *Sphaeranthus indicus* Linn. (Asteraceae) leaf essential oil against human disease vectors, *Culex quinquefasciatus* Say and *Aedes aegypti* Linn., and impacts on a beneficial mosquito predator. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(11), 10294–10306.
- Cheng, J.J. and Fu, L.X. (1989). Effect of deltamethrin on the phosphorylation of proteins from the brain in rat. *Journal of Biochemistry*, 5 (5), 401-405.
- Cheng, S. S., Huang, C. G., Chen, Y. J., Yu, J. J., Chen, W. J. and Chang, S. T. (2009). Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. *Bioresource Technology*, 100, 452–456.
- Choi, W. S., Park, B. S., SK K. and Lee, S. E. (2002). Repellent activities of essential oils and monoterpenes against *Culex pipiens pallens*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 18, 348–351.
- Choochote, W., Chaithong, U., Kamsuk, K., Jitpakdi, A., Tuetun, B. and Champakaew, D. (2007). Repellent activity of selected essential oils against *Aedes aegypti*. *Fitoterapia*, 78, 359–364.

- Chutia, M., Deka Bhuyan, P., Pathak, M. G., Sarma, T. C. and Boruah, P. (2009). Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *LWT - Food Science and Technology*, 42(3), 777–780.
- Conti, B., Canale, A., Bertoli, A., Gozzini, F. and Pistelli, L. (2010). Essential oil composition and larvicidal activity of six Mediterranean aromatic plants against the mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 107(6), 1455–1461.
- Conway, G. R. and Pretty, J. N. (1991). Unwelcomed Harvest. Agriculture and Pollution. Earthscan publication, London, 50-89.
- Corbel, V., Stankiewicz, M., Penetier, C., Fournier, D., Stojan, J., Girard, E., Dimitrov, M., Molgó, J., Hougard, J.-M. and Lapied, B. (2009). Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent DEET. *BMC Biology*, 7, 1-11.
- Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R. and Wyllie, S. G. (2000). The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88, 170–175.
- Craven, R. B., Eliason, D. A., Francy, D. B., Reiter, P., Campos, E. G., Jakob, W. L., Smith, G. C., Bozzi, C. J., Moore, C. G., Maupin, G. O. and Monath, T. P. (1988). Importation of *Aedes albopictus* and other exotic mosquito species into the United States in used tires from Asia. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 4(2), 138-142.
- Curtis, C. F. and Minjas, J. (1985). Expanded polystyrene for mosquito control. *Parasitology Today*, 1(1), 36.
- Da Porto, C., Decorti, D. and Kikic, I. (2009). Flavour compounds of *Lavandula angustifolia* L. to use in food manufacturing: Comparison of three different extraction methods. *Food Chemistry*, 112, 1072-1078.
- Dalla Pozza, G. and Majori, G. (1992). First record of *Aedes albopictus* establishment in Italy. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 8(3): 318-320.
- Damalas, C.A. (2009). Understanding benefits and risks of pesticide use. *Scientific Research and Essays*, 4, 945–949.
- Darbro, J. M., Ritchie, S. A., Thomas, M. B., Johnson, P. H., Ryan, P. A., and Kay, B. H. (2012). Effects of *Beauveria bassiana* on Survival, Blood-Feeding Success, and Fecundity of *Aedes aegypti* in Laboratory and Semi-Field Conditions. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(4), 656–664.
- Das, N. G., Dhiman, S., Talukdar, P. K., Rabha, B., Goswami, D. and Veer, V. (2015). Synergistic mosquito-repellent activity of *Curcuma longa*, *Pogostemon heyneanus* and *Zanthoxylum limonella* essential oils. *Journal of Infection and Public Health*, 8(4), 323–328.
- Das, N. G., Baruah, I., Talukdar, P. K. and Das S. C. (2003). Evaluation of botanicals as repellents against mosquitoes. *Journal of Vector Borne Diseases*. 40, 49–53.

- Davis, K. S. (1971). The Deadly Dust: The Unhappy History of DDT. *American Heritage Magazine*, 22(2).
- Davison, K. L. and Sell, J. L. (1974). DDT thins shells of eggs from mallard ducks maintained on ad libitum or controlled-feeding regimens. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2(3), 222–232.
- Dellagli, M., Sanna, C., Rubiolo, P., Basilico, N., Colombo, E. and Scaltrito, M. M. (2012). Antiplasmodial and insecticidal activities of the essential oils of aromatic plants growing in the Mediterranean area. *Malaria Journal*, 11, 219.
- Derwich, E., Benziane, Z. and Boukir, A. (2010). Chemical composition of leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* and evaluation of its antibacterial activity. *International Journal of Agriculture and Biology*, 12, 199-204.
- Devon T. K. and Scott A. I. (1972). Handbook of naturally occurring compounds. Vol 2. Terpenes. Academic press.
- Dua, V. K., Pandey, A. C., Singh, R., Sharma, V. P. and Subbarao, S. K. (2003). Isolation of repellent ingredients from *Lantana camara* (Verbenaceae) flowers and their repellency against *Aedes* mosquitoes. *Journal of Applied Entomology*, 127(9-10), 509–511.
- Dua, V. K., Gupta, N. C., Pandey, A. C. and Sharma, V. P. (1996). Repellency of *Lantana camara* (Vervanaceae) flowers against *Aedes* mosquitoes. *Journal of American Mosquito Control Association*, 12(3 pt 1), 406–8.
- Dugo, G. and Mondello, L. (2010). Citrus Oils: Composition, Advanced Analytical Techniques, Contaminants, and Biological Activity. CRC Press, Boca Raton, Fla, USA.
- E.C.D.C. (2007). Consultation on vector-related risk for chikungunya virus transmission in Europe. Meeting report. European Centre of Disease Prevention and Control. Paris. 16 pp.
- E.C.D.C. (2009). Development of *Aedes albopictus* risk maps. European Center of Disease Control. Technical report at Stockholm.
- E.C.D.C. (2015). *Aedes albopictus* - factsheet for experts. <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/mosquitoes/Pages/aedes-albopictus.aspx>.
- E.C.D.C. (2017). *Aedes albopictus*—current known distribution in Europe, April 2017. <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/aedes-albopictus-current-known-distribution-europe-april-2017>. Accessed 18/12/2017
- Economou, G., Panagopoulos, G., Karamanos, A., Tarantilis, P., Kalivas, D. and Kotoulas, D. (2014). An assessment of the behavior of carvacrol – rich wild Lamiaceae species from the eastern Aegean under cultivation in two different environments. *Industrial Crops and Products*, 54, 62–69.
- Ejiofor, A. O. (1991). Production of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 as bioinsecticide using a mixture of ‘spent’ brewer’s yeast and waste cassava starch as the fermentation medium. *Discovery Innovation*, 3, 85-88.

- El-Ghorab, A., Shaaban, H. A., El-Massry, K. F. and Shibamoto, T. (2008). Chemical composition of volatile extract and biological activities of volatile and less-volatile extracts of Juniper berry (*Juniperus drupacea* L.) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 6, 5021–5025.
- Enan, E.E. (2001). Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comparative Biochemistry Physiology Toxicology Pharmacology*, 130 (3), 325-337.
- Enan, E.E. (2005). Molecular and pharmacological analysis of an octopamine receptor from American cockroach and fruit fly in response to plant essential oils. *Archive in Insect Biochemistry Physiology*, 59 (3), 161-171.
- Ennajar, M., Afloulous, S., Romdhane, M., Ibrahim, H., Cazaux, S., Abderraba, M. and Bouajila, J. (2011). Influence of the Process, Season, and Origin on Volatile Composition and Antioxidant Activity of *Juniperus phoenicea* L. Leaves Essential Oils. *Journal of Food Science*, 76(2), C224–C230.
- Enserink, G. M. (2008). A Mosquito Goes Global. *Science*, 320: 864-866.
- Enserink, G. M. (2011). Mosquito Trial Alarms Opponents, Strains Ties in Gates-Funded Project. *Science*, 330, 1030–1031.
- Erler, F., Ulug, I. and Yalcinkaya, B. (2006). Repellent activity of five essential oils against *Culex pipiens*. *Fitoterapia*, 77, 491–494.
- Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., García, D. and Pagán, R. (2011). Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*, 22(6), 896–902.
- Evans, P.D. (1981). Multiple receptor types for octopamine in the locust. *Journal of Physiology*, 318, 99-122.
- Evergetis, E., Michaelakis, A. and Haroutounian, A. S. (2012). Essential Oils of Umbelliferae (Apiaceae) Family Taxa as Emerging Potent Agents for Mosquito Control. *Integrated Pest Management and Pest Control - Current and Future Tactics*.
- Evergetis, E., Michaelakis, A., Kioulos, E., Koliopoulos, G. and Haroutounian, S.A. (2009). Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from six Apiaceae family taxa against the West Nile virus vector *Culex pipiens*. *Parasitology Research*, 105, 117–124.
- Felipe, C.F.B., Fonsêca, K.S., Barbosa, A.L.R., Bezerra, J.N.S., Neto, M.A., França Fonteles, M.M. and Barros Viana, G.S. (2008). Alterations in behavior and memory induced by the essential oil of *Zingiber officinale* Roscoe (ginger) in mice are cholinergic-dependent. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2 (7), 163-170.
- Ferhat, M. A., Meklati, B. Y. and Chemat, F. (2007). Comparison of different isolation methods of essential oil from *Citrus* fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave “dry” distillation. *Flavour and Fragrance Journal*, 22(6), 494–504.

- Flacio, E., Lóthy, P., Patocchi, N., Guidotti, F., Tonolla M. and Peduzzi, R. (2004). Primo ritrovamento di *Aedes albopictus* in Svizzera. *Bollettino della Società ticinese di Scienze Naturali*, 92, 141-142.
- Fonseca, D. M., Unlu, I., Crepeau, T., Farajollahi, A., Healy, S. P., Bartlett-Healy, K. and Clark, G. G. (2013). Area-wide management of *Aedes albopictus*. Part 2: Gauging the efficacy of traditional integrated pest control measures against urban container mosquitoes. *Pest Management Science*, 69(12), 1351–1361.
- Fontenille, D., Diallo, M., Mondo, M., Ndiaye, M. and Thonnon, J. (1997). First evidence of natural vertical transmission of yellow fever virus in *Aedes aegypti*, its epidemic vector. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 91(5), 533–535.
- Fradin, M. S. and Day, J. F. (2002). Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. *New England Journal of Medicine*, 347, 13–8.
- Fu, G., Lees, R. S., Nimmo, D., Aw, D., Jin, L., Gray, P. and Alphey, L. (2010). Female-specific flightless phenotype for mosquito control. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(10), 4550–4554.
- Galvão, J. G., Silva, V. F., Ferreira, S. G., França, F. R. M., Santos, D. A., Freitas, L. S. and Nunes, R. S. (2015). β -cyclodextrin inclusion complexes containing *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oil: An alternative to control *Aedes aegypti* larvae. *Thermochimica Acta*, 608, 14–19.
- Genchi, C., Mortarino, M., Genchi, M. and Rinaldi, L. (2009). The spreading of *Dirofilaria* infections in the European countries. 2nd European *Dirofilaria* days. Salamanga, Spain, 1618 September. Edited by Morchón R., Simón F., Montoya J. A., Genchi C.
- Georghiou, P. G. and Taylor, C. (1986). Factors influencing the evolution of resistance: Pesticide Resistance, Strategies and Tactics for Management (ed. National Academic Press). Washigton D.C., pp. 157-169.
- Giatropoulos, A., Kimbaris, A., Michaelakis, Antonios, Papachristos, D. P., Polissiou, M. G., and Emmanouel, N. (2018). Chemical composition and assessment of larvicidal and repellent capacity of 14 Lamiaceae essential oils against *Aedes albopictus*. *Parasitology Research*, 117(6), 1953–1964.
- Giatropoulos, A., Papachristos, D. P., Kimbaris, A., Koliopoulos, G., Polissiou, M. G., Emmanouel, N. and Michaelakis, A. (2012). Evaluation of bioefficacy of three *Citrus* essential oils against the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in correlation to their components' enantiomeric distribution. *Parasitology Research*, 111(6), 2253–2263.
- Giatropoulos, A., Pitarokili, D., Papaioannou, F., Papachristos, D. P., Koliopoulos, G., Emmanouel, N., Tzakou, O. and Michaelakis, A. (2012). Essential oil composition, adult repellency and larvicidal activity of eight *Cupressaceae* species from Greece against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 112(3), 1113–1123.

- Gillij, Y. G., Gleiser, R. M. and Zygadlo, J. A. (2008). Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresource Technology*, 99(7), 2507–2515.
- Glare, T. R. and O’Callaghan, M. (2000). *Bacillus thuringiensis*, biology, ecology and safety. John Wiley and Sons, Chichester, UK. 350pp.
- Gleiser, R. M., Bonino, M. A. and Zygadlo, J. A. (2010). Repellence of essential oils of aromatic plants growing in Argentina against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 108(1), 69–78.
- Gokbulut, I., Bilenler, T. and Karabulut, I. (2013). Determination of Chemical Composition, Total Phenolic, Antimicrobial, and Antioxidant Activities of *Echinophora tenuifolia* Essential Oil. *International Journal of Food Properties*, 16(7), 1442–1451.
- Gokulakrishnan, J., Kuppusamy, E., Shanmugam, D., Appavu, A. and Kaliyamoorthi, K. (2013). Pupicidal and repellent activities of *Pogostemon cablin* essential oil chemical compounds against medically important human vector mosquitoes. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 3(1), 26–31.
- González-Coloma, A., Guadaño, A., Tonn, C. E. and Sosa, M. E. (2005). Antifeedant/Insecticidal Terpenes from Asteraceae and Labiatae Species Native to Argentinean Semi-arid Lands. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 60(11-12), 855–861.
- Govere, J. M. and Durrheim, D. V. (2006). Techniques for evaluating repellents. In: *Insect Repellents: Principles Methods, and Use*. Debboun M, Frances SP, Strickman D, editor. Boca Raton Florida: CRC Press.
- Govere, J., Durrheim, D. N., Baker, L., Hunt, R. and Coetzee, M. (2000a). Efficacy of three insect repellents against the malaria vector *Anopheles arabiensis*. *Medical and Veterinary Entomology*, 14(4), 441–444.
- Govere, J., Durrheim, D.N., Du, T.N., Hunt, R.H. and Coetzee, M. (2000b). Local plants as repellents against *Anopheles arabiensis*, in Mpumalanga Province, South Africa. *Central African Journal of Medicine*, 46, 213–216.
- Govindarajan, M. and Benelli, G. (2016). *Artemisia absinthium*-borne compounds as novel larvicides: effectiveness against six mosquito vectors and acute toxicity on non-target aquatic organisms. *Parasitology Research*, 115(12), 4649–4661.
- Govindarajan, M. and Karuppanan, P. (2011). Mosquito larvicidal and ovicidal properties of *Eclipta alba* (L.) Hassk (Asteraceae) against chikungunya vector, *Aedes aegypti* (Linn.) (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(1), 24–28.
- Govindarajan, M. (2011). Larvicidal and repellent properties of some essential oils against *Culex tritaeniorhynchus* Giles and *Anopheles subpictus* Grassi (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4, 106–111.
- Govindarajan, M., Vaseeharan, B., Alharbi, N. S., Kadaikunnan, S., Khaled, J. M., Al-anbr Mohammed N. and Benelli, G. (2018). High efficacy of (Z)- γ -bisabolene from the essential oil of *Galinsoga parviflora* (Asteraceae) as larvicide and oviposition deterrent

- against six mosquito vectors. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(11), 10555–10566.
- Grandadam, M., Caro, V., Plumet, S., Thiberge, J.M., Souarès, Y., Failloux, A.B., Tolou, H. J., Budelot, M., Cosserrat, D., Leparç-Goffart, I. and Desprès, P. (2011). Chikungunya Virus, Southeastern France. *Emerging Infectious Diseases*, 17(5), 910-913.
- Gratz, N. G. (2004). Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Medical and Veterinary Entomology*, 18, 215-227.
- Grundy, D.L. and Still, C.C. (1985). Inhibition of acetylcholinesterases by pulegone 1, 2- epoxide. *Pesticide Biochemistry Physiology*, 23, 383-388.
- Guenther, E. (1948). *The Essential Oils*. D. Van Nostrand, New York.
- Guth, R. A. (2009). Rocket Scientists Shoot Down Mosquitoes with Lasers. *Wall Street Journal*, March 14th.
- Habel, J. C., Segerer, A., Ulrich, W., Torchyk, O., Weisser, W.W. and Schmitt, T. (2015). Butterfly community shifts over 2 centuries. *Conservation Biology*, 754–762.
- Hafeez, F., Akram, W. and Shaalan, E. A.-S. (2011). Mosquito larvicidal activity of *Citrus* limonoids against *Aedes albopictus*. *Parasitology Research*, 109(1), 221–229.
- Hallmann, C. A., Sorg, M., Jongejans, E., Siepel, H., Hofland, N., Schwan, H., de Kroon, H. (2017). More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. *PLOS ONE*, 12(10), e0185809.
- Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G and Rakesh, D. D. (2008). *Extraction technologies for medical and aromatic plants*. Trieste: International Centre for Science and High Technology.
- Harbach R. F. and Kitching I. J. (1998). Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). *Systematic Entomology*, 23, 327-370.
- Harhour, A., Brada, M., Fauconnier, M.-L. and Lognay, G. (2018). Chemical Composition and Antioxidant Activity of Algerian *Juniperus Phoenicea* Essential Oil. *Natural Product Sciences*, 24(2), 125.
- Harris, A. F., Nimmo, D., McKemey, A. R., Kelly, N., Scaife, S., Donnelly, C. A. and Alphey, L. (2011). Field performance of engineered male mosquitoes. *Nature Biotechnology*, 29(11), 1034–1037.
- Hartmans, K.J., Diepenhorst, P., Bakker, W. and Gorris, L.G.M. (1995). The use of carvone in agriculture: sprout suppression of potatoes and antifungal activity against potato tuber and other plant diseases. *Industrial Crops and Products*, 4, 3 –13.
- Hawley, W. A. (1988). The biology of *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 4 (1), 1-40.
- Hebbalkar, D. S., Hebbalkar, G. D., Sharma, R. N., Joshi, V. S. and Bhat, V. S. (1992). Mosquito repellent activity of oils from *Vitex negundo* Linn. Leaves. *Indian Journal of Medical Research*, 95, 200–3.

- Hendrichs, J., Franz, G. and Rendon, R. (2002). Medfly area-wide sterile insect technique programmes for prevention, suppression, or eradication: the importance of mating behavior. *Florida Entomologist*, 85, 1-13.
- Hold, M.K., Sirisoma, S.N., Ikeda, T., Narahashi, T. and Casida, E.J. (2000). Thujone (the active component of absinthe): aminobutyric acid type. A receptor modulation and metabolic detoxification. *Proceedings of National Academy of Science USA*. 97, 3826-3831.
- Hummelbrunner, L. A. and Isman, M. B. (2001). Acute, sublethal, antifeedant and synergistic effects of monoterpene essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep. Noctuidae). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 715–720.
- Hunter W. N. (2007). The Non-mevalonate Pathway of Isoprenoid Precursor Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 21573-21577.
- Hwang, Y.-S, Wu, K.-H., Kumamoto, J., Axelrod, H. and Mulla M.S. (1985). Isolation and identification of mosquito repellents in *Artemisia vulgaris*. *Journal of Chemical Ecology*, 11, 1297-1306.
- I.S.S.G. (2011). Invasive Species Specialist Group. 100 of the World's Worst Invasive Alien Species: A selection from the Global Invasive Species Database. Retrieved online from: <http://www.issg.org/database/species/search.asp?st=100ss>
- Ibrahim, J. and Zaki, Z. M. (1998). Development of environment-friendly insect repellents from the leaf oils of selected Malaysian plants. *ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation*, 6, 1–7.
- Ilsley, S., Miller, H., Greathead, H. and Kamel, C. (2002). Herbal sow diets boost pre-weaning growth. *Pig Progress*, 18 (4), 8 –10.
- International Development Advisory Board. Malaria Eradication. (1956). Report and Recommendations of the International Development Advisory Board. Washington, DC: International Cooperation Agency.
- IRAC (2011). Prevention and management of insecticide resistance in vectors and pests of public health importance. Insecticide Resistance Action Committee. 2nd edn., 50 pp.
- Ito, J., Ghosh, A., Moreira, L. A., Wimmer, E. A., and Jacobs-Lorena, M. (2002). Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature*, 417(6887), 452–455.
- Iturbe-Ormaetxe, I., Walker, T. and O' Neill, S. L. (2011). Wolbachia and the biological control of mosquito-borne disease. *EMBO Reports*, 12(6), 508–518.
- Jaenson, T. G. T., Garboui, S. and Pålsson, K. (2006). Repellency of Oils of Lemon Eucalyptus, Geranium, and Lavender and the Mosquito Repellent MyggA Natural to *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in the Laboratory and Field. *Journal of Medical Entomology*, 43(4), 731–736.

- Jaenson, T. G. T., Pålsson, K. and Borg-Karlson, A.-K. (2006). Evaluation of Extracts and Oils of Mosquito (Diptera: Culicidae) Repellent Plants from Sweden and Guinea-Bissau. *Journal of Medical Entomology*, 43(1), 113–119.
- James, A. A. (2000). Control of disease transmission through genetic modification of mosquitoes. pp. 319–333. In: *Insect Transgenesis. Methods and Applications*. A. M. Handler and A. A. James, Eds. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Kamsuk, K., Choochote, W., Chaithong, U., Jitpakdi, A., Tippawangkosol, P., Riyong, D. and Pitasawat, B. (2007). Effectiveness of *Zanthoxylum piperitum*-derived essential oil as an alternative repellent under laboratory and field applications. *Parasitology Research*, 100, 339–345.
- Karampoula, F., Giaouris, E., Deschamps, J., Doulgeraki, A.I., Nychas, G.J. and Dubois-Brissonnet, F. (2016). Hydrosol of *Thymbra capitata* is a highly efficient biocide against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium biofilms. *Applied Environmental Microbiology*, 82, 5309–5319.
- Karousou, R., Vokou, D. and Kokkini, S. (1998). Variation of *Salvia fruticose* Essential Oils on the Island of Crete (Greece). *Botanica Acta*, 111(3), 250–254.
- Karunamoorthi, K., Girmay, A. and Hayleeyesus, S.F. (2014). Mosquito repellent activity of essential oil of Ethiopian ethnomedicinal plant against Afro-tropical malarial vector *Anopheles arabiensis*. *Journal of King Saud University - Science*, 26(4), 305–310.
- Karunamoorthi, K., Ilango, K., and Murugan, K. (2010). Laboratory evaluation of traditionally used plant-based insect repellent against the malaria vector *Anopheles arabiensis* Patton (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 106(5), 1217–1223.
- Karunamoorthi, K., Ramanujam, S., and Rathinasamy, R. (2008). Evaluation of leaf extracts of *Vitex negundo* L. (Family: Verbenaceae) against larvae of *Culex tritaeniorhynchus* and repellent activity on adult vector mosquitoes. *Parasitology Research*, 103(3), 545–550.
- Kassir, J. T., Mohsen, Z. H. and Mehdi, N. S. (1989). Toxic effects of limonene against *Cx. quinquefasciatus* Say larvae and its interference with oviposition. *Anzeiger für Schädlingskunde, Pflanzenschutz, Umweltschutz*, 62, 19–21.
- Kazembe, T. C. and Chaibva, M. (2012). Mosquito repellency of whole extracts and volatile oils of *Ocimum americanum*, *Jatropha curcas* and *Citrus limon*. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, 1(8), 65–71.
- Keane, S. and Ryan, M.F. (1999). Purification, characterisation and inhibition of monoterpenes of acetylcholinesterase from the waxmoth, *Galleria mellonella*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29, 1097–1104.
- Kettle, D. S. (1995). *Medical and veterinary entomology*. 2nd edition. CAB International. Cambridge, U.K. 725 pp.

- Khambay, B.P., Batty, D., Jewess, P.J., Bateman, G.L. and Hollomon, D.W. (2003). Mode of action and pesticidal activity of the natural product dunnione and of some analogues. *Pest Management Science*, 59 (2), 174-182.
- Khandagle, A. J., Tare, V. S., Raut, K. D. and Morey, R. A. (2011). Bioactivity of essential oils of *Zingiber officinalis* and *Achyranthes aspera* against mosquitoes. *Parasitology Research*, 109(2), 339–343.
- Kim, D., Kim, S., Chang, K. and Ahn, Y. (2002). Repellent activity of constituents identified in *Foeniculum vulgare* fruit against *Aedes aegypti* (diptera: Culicidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6993–6996.
- Kim, D.-I., Kim, S.-I., Jung, J. W., Ilyasov, R. A., Jang, D., Lee, S.-H. and Kwon, H. W. (2019). Spatial releasing properties and mosquito repellency of cellulose-based beads containing essential oils and vanillin. *Journal of Asia-Pacific Entomology*.
- Kim, S.-I., Yoon, J.-S., Baeck, S.-J., Lee, S.-H., Ahn, Y.-J. and Kwon, H. W. (2012). Toxicity and Synergic Repellency of Plant Essential Oil Mixtures With Vanillin Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 49(4), 876–885.
- Kline, D. L., Bernier, U. R., Posey, K. H. and Barnard, D. R. (2003). Olfactometric Evaluation of Spatial Repellents for *Aedes aegypti*. *Journal of Medical Entomology*, 40(4), 463–467.
- Klobucar, A., Merdic, E., Benic, N., Baklaic, Z. and Krcmar, S. (2006). First record of *Aedes albopictus* in Croatia. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22, 147-148.
- Klocke, J. A., Darlington, M. V. and Balandrin, M. F. (1987). 1,8-Cineole (Eucalyptol), a mosquito feeding and ovipositional repellent from volatile oil of *Hemizonia fitchii* (Asteraceae). *Journal of Chemical Ecology*, 13(12), 2131–2141.
- Knudsen, A. B., Romi, R. and Majori, G. (1996). Occurrence and spread in Italy of *Aedes albopictus*, with implications for its introduction into other parts of Europe. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 12(2), 177-183.
- Kokkini, S. and Vokou, D. (1989). Carvacrol-rich plants in Greece. *Flavour and Fragrance Journal*, 4, 1–7.
- Kokkini, S., Karousou, R. and Hanlidou, E. (2003). Herbs of the Labiatae. In: Caballero, B., Trugo, L., Finglas, P. (Eds.), *Encyclopedia of food science and nutrition*. Second ed. Academic press, London, pp. 3082–3090
- Kostyukovsky, M., Rafaeli, A., Gileadi, C., Demchenko, N. and Shaaya, E. (2002). Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. *Pest Management Science*, 58 (11), 1101-1106.
- Koutsaviti, K., Giatropoulos, A., Pitarokili, D., Papachristos, D., Michaelakis, A. and Tzakou, O. (2014). Greek *Pinus* essential oils: larvicidal activity and repellency against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 114(2), 583–592.

- Kramer, H. L., Kartashev, V. V., Grandi, G., Morchón, R., Nagornii, S. A., Karanis, P. and Simón, F. (2007). Human subcutaneous Dirofilariasis, Russia. *Emerging Infectious Diseases*, 13(1): 150-152.
- Kröber, T., Koussis, K., Bourquin, M., Tsitoura, P., Konstantopoulou, M. and Awolola, T. S. (2018). Odorant-binding protein-based identification of natural spatial repellents for the African malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 96, 36–50.
- Kumar, S., Wahab, N. and Warikoo, R. (2011). Bioefficacy of *Mentha piperita* essential oil against dengue fever mosquito *Aedes aegypti* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1, 85–8.
- Kwon, H. W., Kim, S.-I., Chang, K.-S., Clark, J. M. and Ahn, Y.-J. (2011). Enhanced Repellency of Binary Mixtures of *Zanthoxylum armatum* Seed Oil, Vanillin, and Their Aerosols to Mosquitoes Under Laboratory and Field Conditions. *Journal of Medical Entomology*, 48(1), 61–66.
- Labbé, G. M. C., Scaife, S., Morgan, S. A., Curtis, Z. H. and Alphey, L. (2012). Female-Specific Flightless (fsRIDL) Phenotype for Control of *Aedes albopictus*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(7), e1724.
- Lacroix, R., McKemey, A. R., Raduan, N., Kwee Wee, L., Hong Ming, W., Guat Ney, T. and Murad, S. (2012). Open Field Release of Genetically Engineered Sterile Male *Aedes aegypti* in Malaysia. *PLoS ONE*, 7(8), e42771.
- La-Ruche G., Souarès, Y., Armengaud, A., Peloux-Petiot, F., Delaunay, P., Desprès, P., Lenglet, A., Jourdain, F., Leparç-Goffart, I., Charlet, F., Ollier, L. Mantey, K., Mollet, T., Fournier, J. P., Torrents, R., Leitmeyer, K., Hilairet, P., Zeller, H., Bortel, W. V., DejourSalamanca, D., Grandadam, M. and Gastellu-Etchegorry, M. (2010). First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France. *Eurosurveillance*, 15, 19676.
- Lawrencet, B. M. (2000). Essential oils: From agriculture to chemistry. *The International Journal of Aromatherapy*, 10, 82-98.
- Lees, R. S., Gilles, J., Hendrichs, J., Vreysen, M. J. B. and Bourtzis, K. (2015). Back to the future: the sterile insect technique against mosquito disease vectors. *Current Opinion in Insect Science*, 10, 156-162.
- Levey, M. (1959). *Chemistry and Chemical Technology in Ancient Mesopotamia*. Amsterdam: Elsevier.
- Lomonaco D, Santiago GMP, Ferreira YS, Arriaga AMS, Mazzetto SE, Mele G and Vasapollo G. (2009). Study of technical CNSL and its main components as new green larvicides. *Green Chemistry*, 11, 31-33.

- Louis, C. (2012). Daily newspaper view of Dengue fever epidemic, Athens, Greece, 1927–1931. *Emerging Infectious Diseases*, 18(1), 78-82.
- Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S. and De Poorter, M. (2000). 100 of the World's Worst Invasive Alien Species. A Selection from the Global Invasive Species Database. The Invasive Species Specialist Group (ISSG), 12 p.
- Lundholm, E. (1987). Thinning of eggshells in birds by DDE: Mode of action on the eggshell gland. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 88(1), 1–22.
- Machado, M., Sousa, M. D. C., Salgueiro, L. and Cavaleiro, C. (2010). Effects of essential oils on the growth of *Giardia lamblia* trophozoites. *Natural Products Communications*, 5, 137–141.
- Madakacherry, O., Lees, R. S. and Gilles, J. R. L. (2014). *Aedes albopictus* (Skuse) males in laboratory and semi-field cages: Release ratios and mating competitiveness. *Acta Tropica*, 132, S124–S129.
- Madon, M., Hazelrigg, J., Shaw, M., Klueh, S. and Mulla, M. (2004). Has *Aedes albopictus* established in California? *Journal of the American Mosquito Control Association*, 19, 298.
- MALWEST. (2013). Ειδικό πρόγραμμα ελέγχου για τον ιό του Δυτικού Νείλου και την ελονοσία, ενίσχυση της επιτήρησης στην Ελληνική επικράτεια. Πρακτικά συνάντησης εργασίας (20.07.2013). http://www.malwest.gr/Portals/0/Secured/Annex_3.pdf.
- Manabe, A., Nakayama, S. and Sakamoto, K. (1987). Effects of essential oils on erythrocytes and hepatocytes from rats and dipalitoyl phosphatidylcholine-liposomes. *Japanese Journal of Pharmacology*, 44, 77–84.
- Mandal, S. (2011). Repellent activity of Eucalyptus and *Azadirachta indica* seed oil against the filarial mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) in India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(1), S109–S112.
- Máñez, S., Jiménez, A. and Villar, A. (1991). Volatiles of *Sideritis mugronensis* Flower and Leaf. *Journal of Essential Oil Research*, 3(6), 395–397.
- Marriott, P. J., Shellie, R. and Cornwell, C. (2001). Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*, 936: 1-22.
- Marten, G. G. and Reid, J. W. (2007). Cyclopoid copepods. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23:65–92.
- Martínez, J. L. (2008). Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds, CRC Press, NW.
- Medini, H., Elaissi, A., Farhat, F., Khouja, M. L., Chemli, R. and Harzallah-Skhiri, F. (2009). Seasonal and Geographical Influences on the Chemical Composition of

- Juniperus phoenicea* L. Essential Oil Leaves from the Northern Tunisia. *Chemistry and Biodiversity*, 6(9), 1378–1387.
- Medini, H., Elaissi, A., Larbi Khouja, M., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D. and Chemli, R. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Juniperus phoenicea* L. berries. *Natural Product Research*, 25(18), 1695–1706.
- Medlock, J. M., Hansford, K. M., Schaffner, F., Versteirt, V., Hendrickx, G., Zeller, H., and Bortel, W. V. (2012). A Review of the Invasive Mosquitoes in Europe: Ecology, Public Health Risks, and Control Options. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(6), 435–447.
- Melliou, E., Michaelakis, A., Koliopoulos, G., Skaltsounis, A.-L. and Magiatis, P. (2009). High Quality Bergamot Oil from Greece: Chemical Analysis Using Chiral Gas Chromatography and Larvicidal Activity against the West Nile Virus Vector. *Molecules*, 14(2), 839–849.
- Michaelakis, A., Koliopoulos, G., Milonas, P., Kontodimas, D., Polissiou, M., Kimbaris, A.-C. and Papachristos, D. (2008). Activity of nonoxygenated versus oxygenated monoterpenes against mosquitoes. An attempt to correlate toxicity with chemical structure. In: A 7th Joint meeting of AFERP, GA, PSE and SIF. Natural products with pharmaceutical, nutraceutical, cosmetic and agochemical interest, Athens.
- Michaelakis, A., Papachristos, D., Kimbaris, A., Koliopoulos, G., Giatropoulos, A. and Polissiou, M. G. (2009). *Citrus* essential oils and four enantiomeric pinenes against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 105(3), 769–773.
- Michaelakis, A., Theotokatos, S.A., Koliopoulos, G. and Chorianopoulos, N.G. (2007). Essential oils of *Satureja* species: insecticidal effect on *Culex pipiens* larvae (Diptera: Culicidae). *Molecules*, 12, 2567–2578.
- Mills, M. D., Rader, R. B. and Belk, M. C. (2004). Complex interactions between native and invasive fish: the simultaneous effects of multiple negative interactions. *Oecologia*, 141(4), 713–721.
- Miresmailli, S., and Isman, M. B. (2014). Botanical insecticides inspired by plant–herbivore chemical interactions. *Trends in Plant Science*, 19(1), 29–35.
- Mitchell, C. J. (1995). Geographic Spread of *Aedes albopictus* and Potential for Involvement in Arbovirus Cycles in the Mediterranean Basin. *Journal of Vector Ecology*, 20(1), 44–58.
- Moriarty, F. (1983). *Ecotoxicology. The Study of Pollutants in Ecosystems*. Academic Press, London.
- Mrema, E. J., Rubino, F. M., Brambilla, G., Moretto, A., Tsatsakis, A. M., and Colosio, C. (2013). Persistent organochlorinated pesticides and mechanisms of their toxicity. *Toxicology*, 307, 74–88.
- Murugan, K., Mahesh Kumar, P., Kovendan, K., Amerasan, D., Subrmaniam, J., and Hwang, J.-S. (2012). Larvicidal, pupicidal, repellent and adulticidal activity of *Citrus sinensis*

- orange peel extract against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 111(4), 1757–1769.
- Nanyonga, S. K., Opoku, A., Lewu, F. B. and Oyedeji, A. O. (2012). Chemical Composition and Larvicidal Activity of the Essential Oil of *Tarchonanthus camphoratus* Against *Anopheles arabiensis* Mosquito Larvae. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 15(2), 288–295.
- Nash, J. J. and Erk, K. A. (2017). Stability and interfacial viscoelasticity of oil-water nanoemulsions stabilized by soy lecithin and Tween 20 for the encapsulation of bioactive carvacrol. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 517, 1–11.
- Navayan, A., Moghimipour, E., Khodayar, M.J., Vazirianzadeh, B., Siahpoosh, A., Valizadeh, A. and Mansourzadeh, Z. (2017). Evaluation of the Mosquito Repellent Activity of Nano-sized Microemulsion of Eucalyptus globulus Essential Oil Against Culicinae. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 12(4), e55626.
- Ndava, J., Llera, S.D. and Manyanga, P. (2018). The future of mosquito control: The role of spiders as biological control agents: A review. *International Journal of Mosquito Research*, 5(1), 6-11.
- Nentwig, G. (2003). Use of repellents as prophylactic agents. *Parasitology Research*, 90, 40–48.
- Noosidum, A., Prabaripai, A., Chareonviriyaphap, T. and Chandrapatya, A. (2008). Excitatory-repellency properties of essential oils from *Melaleuca leucadendron* L., *Litsea cubeba* (Lour.) Persoon, and *Litsea salicifolia* (Nees) on *Aedes aegypti* (L.) mosquitoes. *Journal of Vector Ecology*, 33(2), 305–312.
- Nouri, A. and Shafaghatlonbar, A. (2015). Chemical constituents and antioxidant activity of essential oil and organic extract from the peel and kernel parts of *Citrus japonica* Thunb. (kumquat) from Iran. *Natural Product Research*, 30(9), 1093–1097.
- Nzira, L., Per, M., Peter, F. and Claus, B. (2009). *Lippia javanica* (Burm F) Spreng: its general constituents and bioactivity on mosquitoes. *Tropical Biomedicine*, 26, 85–91.
- O’Callaghan, M. and Brownbridge, M. (2009). Environmental Impacts of Microbial Control Agents Used for Control of Invasive Pests. In: Use of Microbes for Control and Eradication of Invasive Arthropods, A.E. Hajek et al., Eds. C Springer, Science + Business Media, B.V.
- Omolo, M.O., Okinyo, D., Ndiege, I.O., Lwande, W. and Hassanali, A. (2004). Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. *Phytochemistry*, 65, 2797–802.
- Oosterhaven, K., Poolman, B. and Smid, E.J. (1995). S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteriostatic compound. *Industrial Crops and Products*, 4, 23–31.

- Oshaghi, M.A., Ghalandari, R., Vatandoost, H., Shayeghi, M., Kamali-Nejad, M., Tourabi-Khaledi, H., Abolhassani, M. and Hashemzadeh, M. (2003). Repellent effect of extracts and essential oils of *Citrus limon* (Rutaceae) and *Melissa officinalis* (Labiatae) against main malaria vector, *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Iranian Journal of Public Health*, 32(4), 47–52.
- Padilha de Paula, J., Gomes-Carneiro, M. R. and Paumgarten, F. J. R. (2003). Chemical composition, toxicity and mosquito repellency of *Ocimum selloi* oil. *Journal of Ethnopharmacology*, 88, 253–260.
- Pampiglione, S. and Rivasi, F. (2001). Dirofilariasis. In the encyclopedia of arthropod transmitted infections, M. W. Service [ed.]. CABI Publishing, Eastbourne, UK, pp. 143-150.
- Pantchev, N., Norden, N., Lorentzen, L., Rossi, M., Rossi, U., Brand, B. and Dyachenko, V. (2009). Current surveys on the prevalence and distribution of *Dirofilaria* spp. in dogs in Germany. *Parasitology Research*, 105(1), 63–74.
- Papaevangelou, G. and Halstead, S. B. (1977). Infections with two dengue viruses in Greece in the 20th century. Did dengue haemorrhagic fever occur in the 1928 epidemic? *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80, 46-51.
- Park, B.-S., Choi, W.-S., Kim, J.-H., Kim, K.-H. and Lee, S.-E. (2005). Monoterpenes from thyme (*Thymus vulgaris*) as potential mosquito repellents. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 21(1), 80–83.
- Paterson, P. (2009). Neem the wonder tree: Its pesticide and medicinal applications. University of Maryland, pp. 56.
- Patsoula, E., Samanidou-Voyadjoglou, A., Spanakos, G., Kremastinou, J., Nasioulas, G. and Vakalis, N. C. (2006). Molecular and Morphological Characterization of *Aedes albopictus* in Northwestern Greece and Differentiation from *Aedes cretinus* and *Aedes aegypti*. *Journal of Medical Entomology*, 43(1), 40–54.
- Paul, A., Harrington, L. C. and Scott, J. G. (2006). Evaluation of Novel Insecticides for Control of Dengue Vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 43(1), 55–60.
- Paupy, C., Delatte, H., Bagny, L., Corbel, V. and Fontenille, D. (2009). *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. *Microbes and Infection*, 11(14-15), 1177–1185.
- Pavela, R. (2015). Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. *Industrial Crops and Products*, 76, 174–187.
- Pavela, R., Maggi, F., Cianfaglione, K., Bruno, M. and Benelli, G. (2017). Larvicidal Activity of Essential Oils of Five Apiaceae Taxa and Some of Their Main Constituents Against *Culex quinquefasciatus*. *Chemistry and Biodiversity*, 15(1), e1700382.
- Pavela, R., Maggi, F., Lupidi, G., Cianfaglione, K., Dauvergne, X., Bruno, M. and Benelli, G. (2017). Efficacy of sea fennel (*Crithmum maritimum* L., Apiaceae) essential oils against

- Culex quinquefasciatus* Say and *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Industrial Crops and Products*, 109, 603–610.
- Pavela, R., Vrchotová, N. and Tríska, J. (2016). Larvicidal activity of extracts from *Ammi visnaga* Linn. (Apiaceae) seeds against *Culex quinquefasciatus* Say. (Diptera: Culicidae). *Experimental Parasitology*, 165, 51–57.
- Perestrelo, R., Silva, C. L., Rodrigues, F., Caldeira, M. and Câmara, J. S. (2016). A powerful approach to explore the potential of medicinal plants as a natural source of odor and antioxidant compounds. *Journal of Food Science and Technology*, 53, 132–144.
- Petrić, D., Pajović, I., Ignjatović, A. and Zgomba, M. (2001). *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) new mosquito species (Diptera, Culicidae) in entomofauna of Yugoslavia. *Plant Doctor, Novi Sad XXIX* 6, 457–458.
- Petric, D., Zgomba, M., Cupina, A., Pajovic, I., Merdic, E., Boca, I., Klobucar, A. and Landeka, N. (2006). Invasion of the *Stegomyia albopicta* to a part of Europe. In: Abstract book of 15th European SOVE Meeting. 10-14 April, 2006. Serres, Greece. pp. 58.
- Phasomkusolsil, S. and Soonwera, M. (2011). Comparative mosquito repellency of essential oils against *Aedes aegypti* (Linn.), *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison) and *Culex quinquefasciatus* (Say). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(1), S113–S118.
- Phukan, S. and Kalita, M.C. (2005). Phytopesticidal and repellent efficacy of *Litsea salicifolia* (Lauraceae) against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 43, 472–474.
- Pichler, V., Malandrucolo, C., Paola, S., Bellini, R., Severini, F., Toma, L. and Caputo, B. (2019). Phenotypic and genotypic pyrethroid resistance of *Aedes albopictus*, with focus on the 2017 chikungunya outbreak in Italy. *Pest Management Science*.
- Pitarokili, D., Michaelakis, A., Koliopoulos, G., Giatropoulos, A. and Tzakou, O. (2011). Chemical composition, larvicidal evaluation, and adult repellency of endemic Greek *Thymus* essential oils against the mosquito vector of West Nile virus. *Parasitology Research*, 109(2), 425–430.
- Pitasawat, B., Choochote, W., Tuetun, B., Tippawangkosol, P., Kanjanapothi, D., Jitpakdi, A. and Riyong, D. (2003) Repellency of aromatic turmeric *Curcuma aromatica* under laboratory and field conditions. *Journal of Vector Ecology*, 28, 234–240.
- Platzer, E. G. (1981). Biological control of mosquitoes with mermithids. *Journal of Nematology*, 13, 257-262.
- Pluskota, B., Storch, V., Braunbeck, T., Beck, M. and Becker, N. (2008). First record of *Stegomyia albopicta* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in Germany. *European Mosquito Bulletin*, 26, 1-5.
- Pollack, A. (2011). Concerns are Raised about Genetically Engineered Mosquitoes. *New York Times*, 30 October, B1.

- Poopathi, S. and Archana, B. (2012). A novel cost-effective medium for the production of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* for mosquito control. *Tropical Biomedicine*, 29(1), 81–91.
- Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution*, 25(6), 345–353.
- Prajapati, V., Tripathi, A. K., Aggarwal, K. K. and Khanuja, S. P. S. (2005). Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Bioresource Technology*, 96, 1749–1757.
- Price, D.N. and Berry, M.S. (2006). Comparison of effects of octopamine and insecticidal essential oils on activity in the nerve cord, foregut, and dorsal unpaired median neurons of cockroaches. *Journal of Insect Physiology*, 52 (3), 309-319.
- Priestley, C. M., Williamson, E. M., Wafford, K. A. and Sattelle, D. B. (2003). Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. *British Journal of Pharmacology*, 140(8), 1363–1372.
- Properzi, A., Angelini, P., Bertuzzi G. and Venanzoni, R. (2013). Some Biological Activities of Essential Oils. *Medicinal and Aromatic Plants*, 2, 136.
- Pujiarti, R. and Fentiyanti, P. K. (2017). Chemical compositions and repellent activity of *Eucalyptus tereticornis* and *Eucalyptus deglupta* essential oils against *Culex quinquefasciatus* mosquito. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41(1), 19–24.
- Pushpanathan, T., Jebanesan, A. and Govindarajan, M. (2006). Larvicidal, ovicidal and repellent activities of *Cymbopogon citratus* Stapf (Graminae) essential oil against the filarial mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae). *Tropical Biomedicine*, 23 (2), 208–212.
- Pushpanathan, T., Jebanesan, A. and Govindarajan, M. (2008). The essential oil of *Zingiber officinalis* Linn (Zingiberaceae) as a mosquito larvicidal and repellent agent against the filarial vector *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 102(6), 1289–1291.
- Quijano, C. E. and Pino, J. A. (2009). Volatile Compounds of Round Kumquat (*Fortunella japonica* Swingle) Peel Oil From Colombia. *Journal of Essential Oil Research*, 21(6), 483–485.
- Radwan, M. A., El-Zemity, S. R., Mohamed, S. A. and Sherby, S. M. (2008). Larvicidal activity of some essential oils, monoterpenoids and their corresponding N-methyl carbamate derivatives against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *International Journal of Tropical Insect Science*, 28(2), 61–68.

- Rajeswary, M. and Govindarajan, M. (2013). Mosquito larvicidal and phytochemical properties of *Ageratina adenophora* (Asteraceae) against three important mosquitoes. *Journal of Vector Borne Diseases*, 50, 141–143.
- Ratcliffe, D.A. (1967). Decreasing eggshell weight in certain birds of prey. *Nature*, 215, 208-211.
- Rather, M. A., Dar, B. A., Sofi, S. N., Bhat, B. A. and Qurishi, M. A. (2016). *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. *Arabian Journal of Chemistry*, 9, S1574–S1583.
- Rattan, R. S. (2010). Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection*, 29(9), 913–920.
- Ravindran, J., Samuel, T., Alex, E. and William, J. (2012). Adulticidal activity of *Ageratum houstonianum* Mill. (Asteraceae) leaf extracts against three vector mosquito species (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2(3), 177–179.
- Regnault-Roger C., Vincent C. and Arnason J. T. (2012). Essential oils in insect control: Low-risk products in a high-stakes world. *Annual Review of Entomology*, 57, 405-424.
- Reisen, W.K., 2003. Lessons from the past: historical studies by the University of Maryland and the University of California, Berkeley. In: Takken, W. and Scott, T. W. eds. Ecological aspects for application of genetically modified mosquitoes. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Frontis series no. 2.
- Reiter P. (2010). Yellow fever and dengue: A threat to Europe? *Euro Surveillance*, 15(10), 19509.
- Reiter, P. and Sprenger, D. (1987). The used tire trade: a mechanism for the worldwide dispersal of container breeding mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 3(3), 494-501.
- Resnik, D. B. (2018). Ethics of community engagement in field trials of genetically modified mosquitoes. *Developing World Bioethics*, 18, 135–143.
- Reynolds, S. E. (1987). The cuticle, growth and moulting in insects: the essential background to the action of acylurea insecticides. *Pesticide Science*, 20, 131-146.
- Rezza, G., Nicoletti, L., Angelini, R., Romi, R., Finarelli, A. C., Panning, M., Cordioli, P., Fortuna, C., Boros, S., Magurano, F. Silvi, G., Angelini, P., Dottori, M., Ciufolini, M. G, Majori, G. C. and Cassone, A. (2007). Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *The Lancet*, 370, 1840–46.
- Romi, R. (1995). History and updating on the spread of *Aedes albopictus* in Italy. *Parassitologia*, 37, 99–103.
- Ruzicka, L. (1953). The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, 50, 395-405.
- Ryan, M.F. and Byrne, O. (1988). Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholineesterase. *Journal of Chemical Ecology*, 14, 1965-1975.

- Sabatini, A., Raineri, V., Trovato, G. and Coluzzi, M. (1990). *Aedes albopictus* in Italia e possibile diffusione della specie nell'area mediterranea. *Parassitologia*, 32, 301-304.
- Samanidou-Voyadjoglou, A., Patsoula, E., Spanakos, G. and Vakalis, N. C. (2005). Confirmation of *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in Greece. *European Mosquito Bulletin*, 19, 10-11.
- Samuel, T., Ravindran, K.J., Eapen, A. and William S.J. (2012). Repellent activity of *Ageratum houstonianum* Mill. (Asteraceae) leaf extracts against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2(6), 478-480.
- Santos, S. R. L., Melo, M. A., Cardoso, A. V., Santos, R. L. C., Sousa, D. P. and Cavalcanti, S. C. H. (2011). Structure–activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Ae. aegypti* Linn. *Chemosphere*, 84, 150–153.
- Saoud, I., Hamrouni, L., Hanana, M., Bouzid, S. and Khouja, M. L. (2010). Ethnobotanical and phytopharmacological notes on *Coridothymus capitatus* (L.) Reichenb. *Fit. Phytotherapia*, 8, 370–373.
- Sarrou, E., Tsivelika, N., Chatzopoulou, P., Tsakalidis, G., Menexes, G. and Mavromatis, A. (2017). Conventional breeding of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) and development of improved cultivars for yield potential and essential oil quality. *Euphytica*, 213(5).
- Sarwar, M. (2015). Reducing Dengue Fever through Biological Control of Disease Carrier Aedes Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *International Journal of Preventive Medicine Research*, 1(3), 161-166.
- Sawamura, M., Thi Minh Tu, N., Onishi, Y., Ogawa, E. and Choi, H.-S. (2004). Characteristic Odor Components of *Citrus reticulata* Blanco (Ponkan) Cold-pressed Oil. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68(8), 1690–1697.
- Schaffner, F., Bortel, W. V. and Coosemans, M. (2004). First record of *Aedes (Stegomyia) albopictus* in Belgium. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 20(2), 201-203.
- Schaffner, F., Bouletreau, B., Guillet, B., Guilloteau, J. and Karch, S. (2001). *Aedes albopictus* established in metropolitan France. *European Mosquito Bulletin*, 9, 1-3.
- Schmutterer, H. (1988). Potential of azadirachtin containing pesticides for integrated pest control in developing and industrialized countries. *Journal of Insect Physiology*, 34, 713-719.
- Scholte, E.J., Den Hartog, W., Dik, M., Schoelitsz, B., Brooks, M., Schaffner, F., Foussadier, R., Braks, M. and Beeuwkes J. (2010). Introduction and control of three invasive mosquito species in the Netherlands. *Euro Surveillance*, 15, 11.
- Scholte, E.-J., Dijkstra, E., Blok, H., Vries, A. D., Takken, W., Hofhuis, A., Koopmans, M., Boer, A. D. and Reusken, C. B. E. M. (2008). Accidental importation of the mosquito *Aedes*

- albopictus* into the Netherlands: a survey of mosquito distribution and the presence of dengue virus. *Medical and Veterinary Entomology*, 22: 352-358.
- Scholte, E.-J., Knols, B. G. J., Samson, R. A. and Takken, W. (2004). Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. *Journal of Insect Science*, 4(1).
- Scholte, E.-J., Takken, W. and Knols, B. G. J. (2007). Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Tropica*, 102(3), 151–158.
- Schreier, P. (1984). Chromatographic studies of biogenesis of plant volatiles. Verlag, Heidelberg, Germany, pp 171.
- Scott, R. P. W. (2005). Essential Oils, Encyclopedia of Analytical Science, Elsevier, pp 554—561.
- Scott, T. W., Takken, W., Knols, B. G. J. and Boëte, C. (2002). The Ecology of Genetically Modified Mosquitoes. *Science*, 298(5591), 117–119.
- Semmler, M., Abdel-Ghaffar, F., Al-Rasheid, K. and Mehlhorn, H. (2009). Nature helps: from research to products against blood-sucking arthropods. *Parasitology Research*, 105, 1483–1487.
- Semmler, M., Abdel-Ghaffar, F., Schmidt, J. and Mehlhorn, H. (2014). Evaluation of biological and chemical insect repellents and their potential adverse effects. *Parasitology Research*, 113, 185–188.
- Seo, S.-M., Jung, C.-S., Kang, J., Lee, H.-R., Kim, S.-W., Hyun, J. and Park, I.-K. (2015). Larvicidal and Acetylcholinesterase Inhibitory Activities of Apiaceae Plant Essential Oils and Their Constituents against *Aedes albopictus* and Formulation Development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(45), 9977–9986.
- Sezik, E., Kocakulak, E., Ozek, T. and Baser, K.H.C. (2009). Essential oils composition of *Juniperus drupacea* Lab. leaf from Turkey. *Acta Pharmaceutica Scientia*, 51, 109–120.
- Shaaban, H. A. and Edris, A. E. (2015). Factors Affecting the Phase Behavior and Antimicrobial Activity of Carvacrol Microemulsions. *Journal of Oleo Science*, 64(4), 393–404.
- Shroyer, D. A. (1986). *Aedes albopictus* and arboviruses: a concise review of the literature. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 2(4), 424-428.
- Shuurmann, G. and Markert, B. (1998). Ecotoxicology: Ecological Fundamentals, Chemical Exposure, and Biological Effects. Wiley, New York.
- Singh, S. P. and Mittal, P. K. (2014). Mosquito repellent action of *Blumea lacera* (Asteraceae) against *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. *International Journal of Mosquito Research*, 1(1), 10-13.
- Singh, K. and Singh, D.K. (2000). Toxicity to the snail *Limnaea acuminata* of plant-derived molluscicides in combination with synergists. *Pest Management Science*. 56, 889-898.
- Siriporn, P. and Mayura, S. (2010). Insect repellent activity of medicinal plant oils against *Aedes aegypti* (Linn.), *Anopheles minimus* (Theobald) and *Culex quinquefasciatus* (Say) based

- on protection time and biting rate. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 41, 831–40.
- Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T. and Arsenakis, M. (1995). Antimicrobial activity of mint essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(9), 2384–2388.
- Solomon, B., Gebre-Mariam, T. and Asres, K. (2012). Mosquito Repellent Actions of the Essential Oils of *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus* and *Eucalyptus citriodora*: Evaluation and Formulation Studies. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 15(5), 766–773.
- Soonwera, M. (2015). Efficacy of essential oils from *Citrus* plants against mosquito vectors *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say). *Journal of Agricultural Technology*, 11(3), 669–681.
- Soumahoro, M.-K., Fontenille, D., Turbelin, C., Pelat, C., Boyd, A., Flahault, A. and Hanslik, T. (2010). Imported Chikungunya Virus Infection. *Emerging Infectious Diseases*, 16(1), 162–163.
- Sprenger, D. and Wuithiranyagool, T. (1986). The discovery and distribution of *Aedes albopictus* in Harris County, Texas. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 2, 217–219.
- Sritabutra, D., Soonwera, M., Waltanachanobon, S. and Pongjai, S. (2011). Evaluation of herbal essential oil as repellents against *Aedes aegypti* (L.) and *Anopheles dirus* Peyton and Harrion. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1, 124–8.
- Storey, K.B., Baust, J.G. and Buescher, P. (1981). Determination of water bound by soluble subcellular components during low-temperature acclimation in the gall fly larva, *Eurosta solidagensis*. *Cryobiology*, 18 (3), 315–321.
- Stojković, D., Soković, M., Glamočljija, J., Džamić, A., Ćirić, A., Ristić, M. and Grubišić, D. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* L. fruits and leaves essential oils. *Food Chemistry*, 128(4), 1017–1022.
- Straalen, N. M. V. (2003). Peer Reviewed: Ecotoxicology Becomes Stress Ecology. *Environmental Science and Technology*, 37(17), 324A–330A.
- Sultana, H. S., Ali, M. and Panda, B. P. (2012). Influence of volatile constituents of fruit peels of *Citrus reticulata* Blanco on clinically isolated pathogenic microorganisms under *in-vitro*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3), S1299–S1302.
- Sumitha, K. V. and Thoppil, J. E. (2015). Larvicidal efficacy and chemical constituents of *O. gratissimum* L. (Lamiaceae) essential oil against *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 115(2), 673–680.
- Sumitha, K.V., Prajitha, V., Sandhya, V.N., Anjana, S. and Thoppil, J. E. (2014). Potential Larvicidal Principles in *Eryngium foetidum* L. (Apiaceae), An Omnipresent Weed, Effective Against *Aedes albopictus* Skuse. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17(6), 1279–1286.

- Tagaris, E., Sotiropoulou, R. E. P., Sotiropoulos, A., Spanos, I., Milonas, P. and Michaelakis, A. (2016). Climate Change Impact on the Establishment of the Invasive Mosquito Species (IMS). *Springer Atmospheric Sciences*, 689–694.
- Tanaka, K., Mizusawa, K. and Saugstad, E.S. (1979). A revision of the adult and larval mosquitoes of Japan (including the Ryukyu Archipelago and the Ogasawara islands) and Korea (Diptera: Culicidae). *Contributions of the American Entomological Institute*, 16, 1–987.
- Tavares, W. de S., Cruz, I., Petacci, F., de Assis Júnior, S. L., de Sousa Freitas, S., Zanuncio, J. C. and Serrão, J. E. (2009). Potential use of Asteraceae extracts to control *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and selectivity to their parasitoids *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae). *Industrial Crops and Products*, 30(3), 384–388.
- Tawatsin, A., Wratten, S.D., Scott, R.R., Thavara, U. and Techandamrongsin, Y. (2001). Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. *Journal of Vector Ecology*, 26, 76–82.
- Tennyson, S., Ravindran, J., Eapen, A. and William, J. (2012). Repellent activity of *Ageratum houstonianum* Mill. (Asteraceae) leaf extracts against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2(6), 478–480.
- Tepe, B., Cakir, A. and Tepe, A. S. (2016). Medicinal uses, phytochemistry, and pharmacology of *Origanum onites* (L.): a Review. *Chemical Biodiversity*, 13, 504–520.
- Theiler, M., Casals, J. and Moutousses, C. (1960). Etiology of the 1927–28 epidemic of dengue in Greece. *Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine*, 103, 244–6.
- Thomas, J. A. (2016). Butterfly communities under threat. *Science*, 353(6296):216–218.
- Tiedje, J. M., Colwell, R. K., Grossman, Y. L., Hodson, R. E., Lenski, R. E., Mack, R. N. and Regal, P. J. (1989). The Planned Introduction of Genetically Engineered Organisms: Ecological Considerations and Recommendations. *Ecology*, 70(2), 298–315.
- Traboulsi, A. F., El-Haj, S., Tueni, M., Taoubi, K., Nader, N. A. and Mrad, A. (2005). Repellency and toxicity of aromatic plant extracts against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). *Pest Management Science*, 61(6), 597–604.
- Traboulsi, A. F., Taoubi, K., El-Haj, S., Bessiere, J. and Rammal, S. (2002). Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). *Pest Management Science*, 58(5), 491–495.
- Trongtokit, Y., Curtis, C. F. and Rongsriyam, Y. (2005). Efficacy of repellent products against caged and free flying *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 36, 1423–31.

- Tuetun, B., Choochote, W., Pongpaibul, Y., Junkum, A., Kanjanapothi, D., Chaithong, U., Jitpakdi, A., Riyong, D., Wannasan, A. and Pitasawat, B. (2009). Field evaluation of G10, a celery (*Apium graveolens*)-based topical repellent, against mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Chiang Mai province, northern Thailand. *Parasitology Research*, 104(3), 515-521.
- Undurraga, E. A., Halasa, Y. A. and Shepard, D. S. (2016). Economic Analysis of Genetically Modified Mosquito Strategies. *Genetic Control of Malaria and Dengue*, 375–408.
- Unlu, I., Farajollahi, A., Strickman, D. and Fonseca, D. M. (2013). Crouching Tiger, Hidden Trouble: Urban Sources of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Refractory to Source-Reduction. *PLoS ONE*, 8(10), e77999.
- Uysal, B., Sozmen, F., Aktas, O., Oksal, B. S. and Kose, E. O. (2011). Essential oil composition and antibacterial activity of the grapefruit (*Citrus Paradisi. L*) peel essential oils obtained by solvent-free microwave extraction: comparison with hydrodistillation. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(7), 1455–1461.
- Van de Braak, S. A. A. J. and Leijten, G. C. J. J. (1999). Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, p. 116.
- Van Krimpen, M. M. and Binnendijk, G. P. (2001). Ropadiar as alternative for antimicrobial growth promoter in diets of weanling pigs. *Rapport Praktijkonderzoek Veehouderij*, 205, 14.
- Velo, E. and Bino, S. (2002). Introduction, establishment and present status of *Aedes albopictus* in Albania. Abstracts of the 2nd European Mosquito Control Association Workshop, Bologna, 7-8.
- Veronesi, R., Carrieri, M., Maccagnani, B., Maini, S. and Bellini, R. (2015). *Macrocyclus albidus* (Copepoda: Cyclopidae) for the biocontrol of *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* in Italy. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 31, 32–43.
- Versteirt, V., Schaffner, F., Garros, C., Dekoninck, W., Coosemans, M. and Van Bortel, W. (2009). Introduction and Establishment of the Exotic Mosquito Species *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) in Belgium. *Journal of Medical Entomology*, 46(6), 1464–1467.
- Völlinger, M. (1987). The possible development of resistance against neem seed kernel extract and deltamethrin in *Plutella xylostella*. In: Schmutterer, H., Ascher, K.R.S. (Eds.), Natural Pesticides from the Neem Tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and Other Tropical Plants. Proceedings of Third International Neem Conference. German Agency for Technical Cooperation (GTZ), Eschborn, Germany, 543-554.
- Vourlioti-Arapi, F., Michaelakis, A., Evergetis, E., Koliopoulos, G. and Haroutounian, S. A. (2012). Essential oils of indigenous in Greece six *Juniperus* taxa. *Parasitology Research*, 110, 1829–1839.

- Voutsina, I. and Karagiannidis, G. (2007). *Aedes albopictus*: monitoring program in Serres Prefecture, Πρακτικά 12ου Πανελληνίου Εντομολογικού Συνεδρίου. Εντομολογική Εταιρεία Ελλάδος, Λάρνακα Κύπρος, 13-16 Νοεμβρίου 2007, σελ. 274.
- Vreysen, M., Saleh, K., Abdulla, A., Zhu, Z., Juma, K., Dyck, V., Msangi, A., Mkonyi, P. and Feldmann, H. (2000). *Glossina austeri* (Diptera: Glossinidae) eradicated on the island of Unguja, Zanzibar, using the sterile insect technique. *Journal of Economic Entomology*, 93(1), 123-135.
- W.H.O. (1982). Manual on environmental management for mosquito control with special emphasis on malaria vectors. World Health Organization. Geneva. 66. pp. 284.
- W.H.O. (1999). Prevention and control of Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever - Comprehensive guidelines. World Health Organization Regional Publication. WHO/SEARO, New Delhi. SEARO No. 29, 134 pp.
- W.H.O. (2006). Guidelines for testing mosquito adulticides for indoor residual spraying and treatment of mosquito nets. Switzerland.
- W.H.O. (2011). The use of DDT in malaria vector control. World Health Organization position statement.
- W.H.O. (2012). Handbook of Integrated Vector Management. World Health Organization. WHO/HTM/NTD/VEM/2012.3.67 pp.
- W.H.O. (2013). "Indoor Residual Spraying. An operational manual for indoor residual spraying (IRS) for malaria transmission control and elimination" apps.who.int/iris/bitstream/10665/80126/1/9789241505123_eng.pdf
- W.H.O. (2014). Guidance framework for testing of genetically modified mosquitoes. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Walker, R. (1998). Toxicity testing and derivation of the ADI. *Food Additives and Contaminants*, 15(sup001), 11–16.
- Watanabe, K., Shono, Y., Kakimizu, A., Okada, A., Matsuo, N., Satoh, A. and Nishimura, H. (1993). New mosquito repellent from *Eucalyptus camaldulensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(11), 2164–2166.
- Weeks, E. N. I., Baniszewski, J., Gezan, S. A., Allan, S. A., Cuda, J. P. and Stevens, B. R. (2018). Methionine as a safe and effective novel biorational mosquito larvicide. *Pest Management Science*.
- Weldon, P. J., Carroll, J. F., Kramer, M., Bedoukian, R. H., Coleman, R. E. and Bernier, U. R. (2011). Anointing Chemicals and Hematophagous Arthropods: Responses by Ticks and Mosquitoes to *Citrus* (Rutaceae) Peel Exudates and Monoterpene Components. *Journal of Chemical Ecology*, 37(4), 348–359.
- West, T. F. and Campbell, G. A. (1946). DDT: the synthetic Insecticide. Chapman and Hall, London.

- Winfree R, Aguilar R, Vázquez DP, LeBuhn G, Aizen M. A. (2009). A meta-analysis of bees' responses to anthropogenic disturbance. *Ecology*, 90(8), 2068–2076.
- Yadav, R., Tikar, S.N., Sharma, A.K., Tyagi, V., Sukumaran, D., Jain, A.K. and Veer, V. (2015). Screening of some weeds for larvicidal activity against *Aedes albopictus*, a vector of dengue and chikungunya. *Journal of Vector Borne Diseases*, 52(1), 88–94.
- Yadav, R., Tyagi, V., Tikar, S.N., Sharma, A.K., Mendki, M.J., Jain, A.K. and Sukumaran, D. (2014). Differential larval toxicity and oviposition altering activity of some indigenous plant extracts against dengue and chikungunya vector *Aedes albopictus*. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 8(2), 174–185.
- Yamamoto, C. and Kurokawa, M. (1970). Synaptic potentials recorded in brain slices and their modification by changes in the level of tissue ATP. *Experimental Brain Research*, 10, 159-170.
- Yang, P. and Ma, Y. (2005). Repellent effect of plant essential oils against *Aedes albopictus*. *Journal of Vector Ecology*, 30, 231–234.
- Yang, Y. C., Lee, E. H., Lee, H. S., Lee, D. K. and Ahn, Y. J. (2004). Repellency of aromatic medicinal plant extracts and a steam distillate to *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 20, 146–149.
- Yunicheva, Y., Ryabova, T. and Markovich, N. (2008). First data on the presence of breeding populations of the *Aedes aegypti* L. mosquito in Greater Sochi and various cities of Abkhazia. *Meditinskaia Parazitologiya I Parazitarnye Bolezni*, 3, 40–43.
- Zgomba, M. and Petric, D. (2008). Risk assessment and management of mosquito-borne diseases in the European region. Proceedings of the Sixth International Conference on Urban Pests William H Robinson and Dániel Bajomi (editors), 29-39.

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Βαλαβανίδης, Α. (2007). Οικοτοξικολογία και Περιβαλλοντική Τοξικολογία. Ερευνητική Μεθοδολογία για την Εκτίμηση Κινδύνου από Χημικές Ουσίες. Τμήμα Χημείας, Παν/μιο Αθηνών.
- Βόντας, Γ., Ροδιτάκης, Ε. και Τσαγκαράκου, Α. (2007). Η μοριακή βάση της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα: παραδείγματα εντόμων ελληνικού γεωπονικού ενδιαφέροντος. *Γεωτεχνικά Επιστημονικά Θέματα*, 1, 18, 61-67.
- Καστοριάδης, Κ. (1993). Η παγκόσμια ανισορροπία και η επαναστατική δύναμη της οικολογίας (Συνέντευξη). *Κοινωνία και Φύση*, τ. 5.
- Κολιόπουλος, Γ., Λύτρα, Ι., Μιχαηλάκης, Α., Κιούλος, Η., Γιατρόπουλος, Α. και Εμμανουήλ, Ν. (2008). Το «Ασιατικό Κουνούπι Τίγρης»: Πρώτη εμφάνιση του *Aedes albopictus* (Skuse) στην Αθήνα. *Γεωργία - Κτηνοτροφία*, 9, 68-73.

- Λιβέρη, Α. (1997). Η χρήση των αρωματικών φυτών και βοτάνων για την παρασκευή αρωμάτων και καλλυντικών στην ελληνική αρχαιότητα. *Φαρμακευτικά και Αρωματικά Φυτά*, 56-82, Ζ' Τριήμερο Εργασίας, Κύπρος, Παραλίμνι, 21/25-3-1997, ΕΤΒΑ, Αθήνα.
- Μανωλάς, Ε. Ι. (2010). Η σιωπηλή άνοιξη της Rachel Carson και η άνοδος του περιβαλλοντικού κινήματος. *Θέματα Δασολογίας και Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων*. 2^{ος} τόμος: Ανάπτυξη Ορεινών και Μειονεκτικών Περιοχών. Ορεστιάδα: Τμήμα Δασολογίας και Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, 225-234.
- Μπέτζιος, Β. Χ. (1989). Αρθρόποδα υγειονομικής σημασίας. *Μορφολογία, βιολογία, οικολογία, υγειονομική σημασία, καταπολέμηση*. Αθήνα.
- Ραγκούση-Ιγνατιάδου, Β. (1996). *Χημεία Φυσικών Προϊόντων*. Αθήνα.
- Σαββοπούλου-Σουλτάνη, Μ., Ανδρεάδης Σ. και Σουλτάνη-Ζουρουλίδη Χ. (2011). Έντομα και άλλα αρθρόποδα υγειονομικής σημασίας. *Βιολογία, οικολογία, αντιμετώπιση*. Θεσσαλονίκη.
- Σαμανίδου-Βογιατζόγλου, Α. (2011). Τα Κουνούπια της Ελλάδας, *Μορφολογία, Βιολογία, Δημόσια υγεία, Κλείδες προσδιορισμού, Αντιμετώπιση*. Εκδόσεις ΑγροΤύπος Α.Ε.
- Σαρλής, Γ. (1994). *Αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά*. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
- Τζανακάκης, Μ. Ε. (1995). *Εντομολογία*. University Studio Press, Θεσσαλονίκη.

Παράρτημα

Πίνακας 1. Λεπτομερής καταγραφή της χημικής σύστασης των 13 αιθερίων ελαίων του είδους *Juniperus phoenicea* που μελετήθηκαν στη διατριβή.

| Συστατικά | J 01 | J 02 | J 03 | J 04 | J 05 | J 06 | J 09 | J 10 | J 11 | J 14 | J 15 | J 16 | J 17 | Ταυτοποίηση |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| τρικυκλένιο | 0,92 | 0,88 | | | | | | | | | | | | a, b |
| α -πινένιο | 50,59 | 53,59 | 60,52 | 77,26 | 31,12 | 70,45 | 59,64 | 43,82 | 63,72 | 21,76 | 32,05 | 48,69 | 57,58 | a, b, c |
| καμφένιο | 2,43 | 2,11 | 1,24 | 0,79 | 0,91 | 1,03 | t | 0,75 | 1,12 | | 0,5 | | 0,9 | a, b, c |
| βερμπενένιο | | | | | 2,02 | 0,63 | | | | | | | | a, b |
| σαμπινένιο | | | | 0,56 | | | | | 0,52 | | | | | a, b, c |
| 1- β -πινένιο | 3,51 | 4,46 | 5,72 | 4,00 | 2,78 | 4,85 | 1,49 | 1,64 | 2,8 | 1,71 | 2,28 | 2,32 | 3,43 | a, b, c |
| μυρκένιο | 7,95 | 8,93 | 6,39 | 5,63 | 2,48 | 3,99 | 5,23 | 5,98 | 4,14 | 7,36 | 7,9 | 5,45 | 5,24 | a, b, c |
| (+)-2-καρένιο | | | | | | | | | | 0,57 | 0,81 | | | a, b |
| α -φελλανδρένιο | 1,58 | 1,67 | | | | | 3,25 | 3,8 | | 6,7 | 5,99 | 2,82 | 1,41 | a, b |
| (+)-3-καρένιο | 0,87 | 0,87 | 1,17 | t | 2,69 | 2,85 | | | 8,21 | | | 3,9 | 5,08 | a, b, c |
| <i>o</i> -κυμένιο | 2,82 | 2,82 | | | | | | | | | | | | a, b |
| π -κυμένιο | | | | | 2,75 | 1,84 | 2,64 | 2,93 | | | | 1,3 | | a, b |
| β -φελλανδρένιο | 8,83 | 7,33 | 3,66 | 2,63 | 2,21 | 3,74 | 17,21 | 19,6 | 1,97 | 28,38 | 30,37 | 18,11 | 8,27 | a, b, c |
| γ -τερπινένιο | 1,35 | 1,29 | | t | | | t | 0,72 | t | 0,41 | 0,48 | | 0,41 | a, b, c |
| α -τερπινολένιο | 1,56 | 1,48 | 1,19 | 0,93 | | t | 1,21 | 1,31 | 1,61 | 2,1 | 1,82 | 1,74 | 1,75 | a, b |
| λιναλοόλη | | | | | | | | | | | 0,72 | | | a, b |
| π -μενθ-2-εν-1-όλη | | | | | | | | | | 1,04 | 0,36 | | | a, b |
| αλδεΐδη του α -καμφολενίου | 2,72 | 1,69 | | | 5,09 | 1,53 | t | 0,73 | | | t | | | a, b |
| <i>trans</i> -πινοκαρβεόλη | 3,67 | 2,49 | | | | | t | 1,06 | | | 0,52 | | | a, b |
| βερμπενόλη | | | | | | 1,44 | | | | | | | | a, b |
| καμφορά | 0,75 | 0,64 | 3,55 | t | | t | | | 1,24 | t | | 2,23 | 1,31 | a, b, c |
| π -μενθα-1,5-διεν-8-όλη | 0,68 | 0,55 | | | 5,02 | t | | | | | | | | a, b |
| <i>trans</i> - π -μενθ-2-ενο-1,8-διόλη | | | 0,63 | | 5,33 | 1,36 | | 0,54 | | | | | | a, b |
| ισοπινोκαμφόνη | | | 0,63 | | | | | | | | | | | a, b |
| 4-τερπιενόλη | 0,79 | 0,58 | 0,85 | | 0,7 | t | | | 0,64 | t | | 0,88 | | a, b, c |
| κρυπτόνη | | | | | 2,29 | t | | | | | 0,46 | | | a, b |
| α -τερπιενόλη | 3,23 | 2,33 | 3,07 | t | | 1,93 | 1,12 | 1,58 | 0,87 | 2,67 | 6,13 | 8,21 | 3,05 | a, b |
| μυρτενόλη | 0,68 | 0,68 | | | | t | | t | | | | | | a, b |

Πίνακας 1. Συνέχεια

| | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|---------|
| βερμπενόνη | | | 1,02 | | 2,24 | t | | | | | | | | a, b |
| <i>trans</i> -(+)-καρβεόλη | 1,10 | 0,6 | | | 2,40 | t | | | | | | | | a, b |
| (+)-καρβόνη | | | | | 0,43 | | | | | | | | | a, b |
| πιπεριτόνη | | | | | 1,67 | | 0,83 | 1,02 | | 5,84 | 1,92 | 1,98 | 0,56 | a, b |
| ισοπουλογκυλόλη οξικός εστέρας | | | | | | | 1,27 | 2,18 | 0,93 | t | t | | | a, b |
| καρβακρόλη | | | | | | | | | | 0,82 | | | | a, b, c |
| α -τερπινυλόλη οξικός εστέρας | | | 0,64 | | 0,64 | | 6,01 | 8,6 | 1,26 | 15,35 | 3,15 | | | a, b |
| β -ελεμένιο | | | | | | | | | t | | | | | a, b |
| β -καρνοφυλλένιο | | | 1,33 | 1,76 | 0,35 | 0,65 | t | 0,69 | 1,9 | t | 0,45 | | 1,71 | a, b, c |
| α -χουμουλένιο | | | 0,72 | 0,92 | 0,25 | t | | t | 0,99 | | 0,56 | | 0,94 | a, b, c |
| γερμακρένιο-D | 0,65 | 0,65 | 4,43 | 5,47 | 0,68 | 0,88 | t | 1,02 | 6,59 | 1,07 | 0,7 | 1,48 | 5,69 | a, b, c |
| <i>επι</i> -δικυκλοσεσκιφελανδρένιο | | | | | | | | | | | 0,62 | | | a, b |
| δ -καδινένιο | 1,53 | 1,43 | | | | | | t | t | 0,54 | 0,97 | | | a, b |
| ελεμόλη | | | | | | | | | | 0,53 | | | | a, b |
| γερμακρένιο-B | | | 1,02 | t | | | | | 0,83 | 0,55 | t | | 1,98 | a, b |
| οξειδίο του καρνοφυλλενίου | | | | | 0,93 | t | | 0,67 | | | | | | a, b |
| Σύνολο | 96,63 | 94,00 | 97,78 | 99,95 | 74,98 | 99,18 | 99,9 | 98,64 | 99,34 | 97,4 | 98,76 | 99,11 | 99,31 | |

Η παράθεση των συστατικών έχει γίνει κατά σειρά έκλουσης από χρωματογραφική στήλη τύπου HP-5MS

t: ανιχνεύτηκε σε ίχνη

Η ταυτοποίηση των συστατικών επιτεύχθηκε ως:

a: σύγκριση με το Δείκτη Ανάσχεσης (=RI-Retention Index), ο οποίος υπολογίζεται με βάση τη συσχέτιση με ένα πρότυπο μίγμα κανονικών αλκανίων (C5-C24)

b: σύγκριση με το φάσμα μάζας

c: σύγκριση με το χρόνο κατακράτησης εμπορικά διαθέσιμων μορίων

Πίνακας 2. Λεπτομερής καταγραφή της χημικής σύστασης των 12 αιθερίων ελαίων του είδους *Juniperus drupacea* που μελετήθηκαν στη διατριβή

| Συστατικά | J 18 | J 19 | J 21 | J 23 | J 25 | J 26 | J 28 | J 29 | J 30 | J 31 | J 32 | J 33 | Ταυτοποίηση |
|----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| <i>α</i> -πινένιο | 19,16 | 18,08 | 45,13 | 49,04 | 21,06 | 21,33 | 36,69 | 8,85 | 9,25 | 38,03 | 36,63 | 24,32 | a, b, c |
| 1- <i>β</i> -πινένιο | | | 1,52 | | 1,10 | 1,11 | 1,63 | | | | 1,75 | 1,70 | a, b, c |
| μυρκένιο | | 2,38 | 2,46 | 2,11 | 2,96 | 3,06 | 2,50 | 3,14 | 3,01 | 3,14 | 2,83 | 3,26 | a, b, c |
| <i>α</i> -φελλανδρένιο | | 2,38 | | | | | | | | | | | a, b |
| (+)-3-καρένιο | 4,95 | 4,56 | | | 2,57 | 2,78 | | 8,57 | 8,53 | | | | a, b, c |
| λεμονένιο | 72,65 | 41,58 | 28,14 | 34,36 | 64,91 | 56,12 | 35,85 | 63,64 | 59,71 | 55,44 | 36,50 | 32,72 | a, b, c |
| <i>α</i> -τερπινολένιο | | | 0,94 | | | | 1,35 | | | | 1,01 | 1,62 | a, b |
| <i>α</i> -τερπινεόλη | | 1,08 | | | | | | 1,67 | 1,39 | | | 0,93 | a, b |
| <i>α</i> -κουμπεμπένιο | | 1,74 | 1,29 | | 1,07 | 1,68 | 1,28 | 1,09 | 1,29 | | | 1,22 | a, b |
| <i>α</i> -κοπαένιο | | 2,32 | 1,52 | | 1,43 | 2,23 | 1,63 | | | | | 1,41 | a, b |
| <i>β</i> -καρσοφυλλένιο | | 1,16 | 1,24 | | | 0,93 | 1,03 | 0,97 | 1,23 | | 1,18 | 1,94 | a, b, c |
| <i>α</i> -χουμουλένιο | | 1,08 | 1,06 | | | 0,80 | | | 1,15 | | 1,10 | 1,85 | a, b, c |
| <i>α</i> -αμορφένιο | | 0,92 | | 3,25 | | 0,75 | 1,96 | | | | | | a, b |
| γερμακρένιο-D | 3,11 | 6,30 | 12,72 | 5,26 | 2,55 | 5,65 | 9,24 | 8,66 | 11,65 | 3,28 | 16,19 | 20,08 | a, b, c |
| <i>R</i> -κουρκουμένιο | | 3,07 | | | 1,09 | | | | | | | | a, b |
| <i>α</i> -μουρολένιο | | | | | | | | | | | | 0,65 | a, b |
| <i>γ</i> -καδινένιο | | 3,66 | 1,85 | 2,70 | 1,17 | 1,56 | 1,64 | 2,10 | 2,72 | | 1,42 | 1,92 | a, b |
| <i>δ</i> -καδινένιο | | 1,44 | 2,01 | 3,23 | | 1,29 | 2,14 | | | | 1,35 | 2,88 | a, b |
| οξειδίο του καρναφυλλενίου | | 1,45 | | | | | | | | | | | a, b |
| τοταρόλη | | | | | | | 1,89 | | | | | 1,03 | a, b |
| Σύνολο | 99,87 | 93,20 | 99,88 | 99,95 | 99,91 | 99,29 | 98,83 | 98,69 | 99,93 | 99,89 | 99,96 | 97,53 | |

Η παράθεση των συστατικών έχει γίνει κατά σειρά έκλουσης από χρωματογραφική στήλη τύπου HP-5MS

t: ανιχνεύτηκε σε ίχνη

Η ταυτοποίηση των συστατικών επιτεύχθηκε ως:

a: σύγκριση με το Δείκτη Ανάσχεσης (=RI-Retention Index), ο οποίος υπολογίζεται με βάση τη συσχέτιση με ένα πρότυπο μίγμα κανονικών αλκανίων (C5-C24)

b: σύγκριση με το φάσμα μάζας

c: σύγκριση με το χρόνο κατακράτησης εμπορικά διαθέσιμων μορίων

Πίνακας 3. Συνέχεια

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--|---------|
| β-μπισαμπολένιο | | | | 1,46 | 0,23 | 2,15 | | | | | | | | a, b, c |
| δ-καδινένιο | | | 1,41 | | | | | | | | | | | a, b |
| νουτκατόνη | 1,08 | | 0,49 | | | | | | | | | | | a, b |
| Σύνολο | 79,77 | 98,88 | 99,98 | 73,35 | 99,78 | 99,98 | 83,51 | 99,95 | 99,94 | 87,93 | 99,90 | 99,89 | | |

Η παράθεση των συστατικών έχει γίνει κατά σειρά έκλουσης από χρωματογραφική στήλη τύπου HP-5MS

t: ανιχνεύτηκε σε ίχνη

Η ταυτοποίηση των συστατικών επιτεύχθηκε ως:

a: σύγκριση με το Δείκτη Ανάσχεσης (=RI-Retention Index), ο οποίος υπολογίζεται με βάση τη συσχέτιση με ένα πρότυπο μίγμα κανονικών αλκανίων (C5-C24)

b: σύγκριση με το φάσμα μάζας

c: σύγκριση με το χρόνο κατακράτησης εμπορικά διαθέσιμων μορίων

Πίνακας 4. Λεπτομερής καταγραφή της χημικής σύστασης των έξι αιθερίων ελαίων των καρπών *Citrus x paradisi*, *C. limon*, *C. reticulata*, *C. sinensis*, *C. japonica* και *C. aurantium* που μελετήθηκαν στη διατριβή.

| Συστατικά | C 04 | C 08 | C 12 | C 16 | C 17 | C 18 | Ταυτοποίηση |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| 3-φαινοξυ-φαινόλη | 0,12 | | | | | | a, b |
| 1-μέθυλ-1,4-κυκλοεξαδιένιο | | t | | | | | a, b |
| 3-μεθυλ-2-βουτεν-1-όλη | | t | | | | | a, b |
| οκτάνιο | | t | | | | | a, b |
| ξυλένιο | | t | | | | | a, b |
| επτανάλη | | t | | | | | a, b |
| α-θουγένιο | | 0,50 | | | | | a, b, c |
| α-πινένιο | 0,46 | 2,80 | 0,68 | 0,48 | 0,54 | 0,36 | a, b, c |
| καμφένιο | | 0,31 | | | | | a, b, c |
| σαμπινένιο | 0,32 | | 0,14 | 0,13 | | | a, b |
| β-πινένιο | | 13,35 | | | | 0,66 | a, b, c |
| μυρκένιο | 2,27 | 2,43 | 2,25 | 2,13 | 2,99 | 1,77 | a, b, c |
| N-οκτανάλη | 1,55 | 1,32 | 2,61 | 2,61 | | 1,61 | a, b |
| α-τερπινένιο | 0,27 | 0,73 | | | | 0,13 | a, b, c |
| π-μενθα-1,5,8-τριένιο | | | | | 0,12 | | a, b |
| D-λεμονένιο | 77,70 | 29,64 | 89,34 | 82,92 | 89,26 | 82,64 | a, b, c |
| cis-οκιμένιο | | 0,17 | | | | | a, b |
| trans-β-οκιμένιο | 0,40 | 0,32 | | | | 0,32 | a, b |
| γ-τερπινένιο | 0,34 | 13,09 | | | | 0,12 | a, b, c |
| οξείδιο της trans-λιναλοόλης | 3,25 | | | | | 2,01 | a, b |
| 1-οκτανόλη | | | 0,11 | 0,87 | | | a, b |
| οξείδιο της cis-λιναλοόλης | 1,56 | | | | | 1,07 | a, b |
| τερπινολένιο | | 3,17 | | t | | | a, b |
| α-τερπινολένιο | 1,31 | 1,33 | 1,43 | 5,72 | 0,18 | 2,82 | a, b |
| εννεανάλη | 0,18 | 0,71 | | 0,23 | | 0,11 | a, b |
| φενχόλη | | 0,28 | | | | | a, b |
| 1,5,8-π-μενθατριένιο | | 0,11 | | | | | a, b |
| καμφορά | | t | | | | | a, b |
| β-τερπινεόλη | 0,2 | 0,53 | | | 0,54 | 0,31 | a, b |
| 1,2,3,4-τετραμεθυλοβενζένιο | | 0,10 | | | | | a, b |
| ισοπουλεγόλη | | 0,22 | | | | | a, b |
| σιτρονελάλη | 0,22 | | | 0,15 | | | a, b |
| π-μενθα-1,5-διεν-8-όλη | | 1,26 | | | | | a, b |
| 4-τερπινεόλη | 1,12 | 3,30 | 0,19 | 0,3 | 0,18 | 0,47 | a, b |
| μεθυλακετοφαινόνη | | 0,11 | | | | | a, b |
| α-τερπινεόλη | 1,31 | 10,23 | 0,64 | 1,14 | 2,12 | 3,13 | a, b |
| 4,7-διμεθυλο-δικυκλο[3.2.1]-3-οκτεν-6-όνη | | | 0,22 | | | | a, b |
| γ-πυρονένιο | | 0,25 | | | | | a, b |
| σαφρανάλη | | 0,17 | | | | | a, b |
| δεκανάλη | 0,70 | | 0,57 | 0,82 | | 0,40 | a, b |
| 1,2,3,4-τετραυδρο-1,1,6-τριμεθυλ-ναφθαλένιο | | 0,12 | | | | | a, b |
| trans-καρβεόλη | 0,56 | | 0,16 | 0,18 | 0,67 | | a, b |
| cis-καρβεόλη | | | | | 0,23 | | a, b |
| νεράλη | | 1,94 | | | | | a, b |
| καρβόνη | | | 0,16 | 0,29 | | 0,26 | a, b |

Πίνακας 4. Συνέχεια

| | | | | | | |
|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| γερανιόλη | | | 0,11 | | 0,18 | a, b |
| βενζοϊκός μεθυλεστεράς | | 0,24 | | | 0,36 | a, b |
| κιτράλη | 0,14 | 3,24 | 0,67 | | | a, b |
| peryl acetate | | 1,54 | | 0,38 | | a, b |
| λαβαντουλόλη οξικός εστέρας | | | | | 0,14 | a, b |
| β-καρυοφυλλένιο | 1,01 | 0,20 | | | | a, b, c |
| α-χουμουλένιο | t | | | | | a, b, c |
| γερμακρένιο-D | | | | 0,46 | | a, b, c |
| βαλενσένιο | 0,21 | 0,24 | 0,10 | | | a, b |
| δικυκλογερμακρένιο | | t | | | | a, b |
| α-μπισαμπολένιο | | t | | | | a, b |
| β- μπισαμπολένιο | | 0,58 | | | | a, b, c |
| δ-καδινένιο | t | | | | | a, b |
| δ-σελινένιο | t | | | | | a, b |
| γ- σελινένιο | 0,32 | | | | | a, b |
| β-κοστόλη | t | | | | | a, b |
| νουτκατόνη | 2,35 | | | | 0,21 | a, b |
| εικοσιπεντάνιο | 0,12 | t | | | | a, b |
| Σύνολο | 97,99 | 94,89 | 98,74 | 98,85 | 97,67 | 99,08 |

Η παράθεση των συστατικών έχει γίνει κατά σειρά έκλουσης από χρωματογραφική στήλη τύπου HP-5MS

t: ανιχνεύτηκε σε ίχνη

Η ταυτοποίηση των συστατικών επιτεύχθηκε ως:

a: σύγκριση με το Δείκτη Ανάσχεσης (=RI-Retention Index), ο οποίος υπολογίζεται με βάση τη συσχέτιση με ένα πρότυπο μίγμα κανονικών αλκανίων (C5-C24)

b: σύγκριση με το φάσμα μάζας

c: σύγκριση με το χρόνο κατακράτησης εμπορικά διαθέσιμων μορίων

Πίνακας 5. Λεπτομερής καταγραφή της χημικής σύστασης των αιθερίων ελαίων των οχτώ υπό διερεύνηση αρωματικών-αρτυματικών *taxa* και του είδους *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (V17) που χρησιμοποιήθηκε στις βιοδοκιμές πεδίου της διατριβής.

| Συστατικά | V 01 | V 05 | V 06 | V 09 | V 10 | V 12 | V 14 | V 15 | V 16 | V17 | Ταυτοποίηση |
|-----------------------------------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| <i>α</i> -θουγένιο | | | 0,17 | 0,42 | 1,05 | 1,25 | 0,11 | 0,71 | 1,21 | 0,20 | a, b |
| <i>α</i> -πινένιο | 0,20 | | 0,55 | 5,47 | 0,60 | 0,51 | 1,18 | 5,90 | 2,82 | 0,20 | a, b, c |
| καμφένιο | | | | 0,38 | 0,20 | 0,18 | 0,27 | | 1,20 | 0,10 | a, b, c |
| σαμπινένιο | 0,29 | | 0,05 | | | 0,12 | 0,05 | 20,72 | | | a, b, c |
| <i>β</i> -πινένιο | 0,13 | | 0,09 | 12,93 | 0,10 | 0,10 | 0,05 | | 1,38 | 0,10 | a, b |
| 1-οκτεν-3-όλη | | | | | 0,10 | 0,17 | | 0,06 | 0,27 | | a, b |
| μυρκένιο | | | 0,22 | 3,25 | 1,22 | 1,43 | 3,28 | 1,98 | 1,70 | 0,30 | a, b, c |
| 2-οκτανόλη | 0,49 | | | | | | | | | | a, b |
| 3-οκτανόλη | | | | | | | | | 0,05 | | a, b, c |
| <i>α</i> -φελλανδρένιο | | 3,27 | 32,51 | | 0,20 | 0,19 | 9,38 | 0,51 | 0,26 | | a, b, c |
| <i>n</i> -οκτανάλη | 0,14 | | | | | | | | | | a, b, c |
| (+)-3-καρένιο | | | | | 0,11 | 0,08 | 19,73 | 0,03 | 0,10 | 0,10 | a, b, c |
| <i>α</i> -τερπινένιο | | | 0,94 | 0,50 | 1,49 | 1,14 | 0,34 | 1,70 | 2,38 | 0,30 | a, b |
| <i>π</i> -κυμένιο | | 1,23 | 10,34 | | 6,87 | 4,68 | 0,69 | 0,26 | 14,45 | 0,30 | a, b |
| λεμονένιο | 5,11 | | | | | | 3,95 | | 0,91 | | a, b, c |
| <i>β</i> -φελλανδρένιο | | 0,78 | 6,51 | | 0,44 | 0,38 | | | | 0,20 | a, b |
| ευκαλυπτόλη | | | | 53,95 | | | | 30,72 | | | a, b |
| <i>trans</i> - <i>β</i> -οκιμένιο | | | | | | 0,09 | | 0,65 | | | a, b |
| <i>γ</i> -τερπινένιο | 0,08 | | 0,60 | 1,02 | 9,26 | 4,28 | 1,48 | 2,66 | 19,90 | 1,4 | a, b |
| <i>D</i> -φενχόνη | | | | | | | 14,54 | | | | a, b |
| <i>α</i> -τερπινολένιο | | | 0,52 | | 0,38 | 0,15 | | 0,65 | 0,40 | | a, b |
| 2-εννεανόνη | 52,69 | | | | | | | | | | a, b, c |
| 2-δεκανόλη | 0,52 | | | | | | | | | | a, b, c |
| λιναλοόλη | | | | | | | | 0,31 | | | a, b, c |
| <i>β</i> -θουγιόνη | | | | 3,63 | | | | | | | a, b, c |
| εννεανάλη | 0,25 | | | | | | | 0,04 | | | a, b |
| <i>α</i> -θουγιόνη | | | | 2,11 | | | | | | | a, b |
| καμφορά | | | | 0,91 | | | | | | | a, b |
| βορνεόλη | | | | | 0,85 | 0,72 | | | 1,71 | 0,20 | a, b, c |
| 4-τερπινεόλη | 0,27 | | | 1,94 | 0,55 | 1,19 | | 6,40 | 0,64 | 0,20 | a, b, c |
| <i>α</i> -τερπινεόλη | | | | 0,97 | | | | 5,38 | | | a, b, c |
| 2-δεκανόνη | 0,85 | | | | | | | | | | a, b |
| <i>π</i> -αλυσανόλη | | | | | | | 36,37 | | | | a, b, c |
| <i>n</i> -οκτανόλη | 0,11 | | | | | | | | | | a, b, c |
| οξικός εστέρας | | | | | | | | | | | a, b |
| οξικός | | | | | | | 7,76 | | | | a, b |
| φενχυλεστέρας | | | | | | | | | | | a, b |
| μεθυλαιθέρας της καρβακρόλης | | | | | | | | | 0,68 | 0,10 | a, b |
| 1-εννεανένιο | 0,61 | | | | | | | | | | a, b |
| οξικός βορνυλεστέρας | | | | | | | 0,23 | 0,07 | | | a, b |
| πρεγινελένιο | 1,00 | | | | | | | | | | a, b |
| 2-ενδεκανόνη | 32,38 | | | | | | | | | | a, b |
| θυμόλη | | | 0,09 | | 0,47 | 0,58 | | | 0,22 | 2,40 | a, b, c |
| καρβακρόλη | | | 0,47 | | 70,04 | 75,05 | | | 44,66 | 88,70 | a, b, c |

Πίνακας 5. Συνέχεια

| | | | | | | | | | | | | |
|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------|--|---------|
| a- τερπινελόλη οξικός εστέρας | | | | | | | | | | 2,98 | | a, b, c |
| μεθυλο-ευγενόλη | 94,16 | 43,75 | | | | | | | | | | a, b, c |
| β-καρνοφυλλένιο | | | 2,83 | 4,21 | 1,11 | | 0,58 | 2,45 | 0,60 | | | a, b, c |
| α-χουμουλένιο | | | 0,77 | 0,12 | | | | 0,12 | | | | a, b, c |
| trans-β- φαρνεσένιο | | | | | | | | | 3,42 | | | a, b |
| γερμακρένιο-D | | | 0,03 | | 0,76 | 0,09 | | | | | | a, b, c |
| δικυκλο- γερμακρένιο | | | | | 0,61 | | | | 3,74 | | | a, b |
| β-μπισαμπολένιο | | | | | 1,51 | | | | | | | a, b, c |
| σπαθουλενόλη | | | | | | | | | 0,47 | | | a, b, c |
| οξείδιο του καρνοφυλλενίου | | | 1,82 | 0,51 | 0,21 | | 0,37 | 0,68 | | | | a, b |
| γ-γουργιουνένιο | | | 1,13 | | | | | | | | | a, b |
| σελινα-3,7(11)- διένιο | | | | | | | | | 1,14 | | | a, b |
| Σύνολο | 95,12 | 99,44 | 96,72 | 94,06 | 98,77 | 96,49 | 99,50 | 91,45 | 98,19 | | | |

Η παράθεση των συστατικών έχει γίνει κατά σειρά έκλουσης από χρωματογραφική στήλη τύπου HP-5MS

t: ανιχνεύτηκε σε ίχνη

Η ταυτοποίηση των συστατικών επιτεύχθηκε ως:

a: σύγκριση με το Δείκτη Ανάσχεσης (=RI-Retention Index), ο οποίος υπολογίζεται με βάση τη συσχέτιση με ένα πρότυπο μίγμα κανονικών αλκανίων (C5-C24)

b: σύγκριση με το φάσμα μάζας

c: σύγκριση με το χρόνο κατακράτησης εμπορικά διαθέσιμων μορίων