



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

**Διδακτορική Διατριβή**

Μοριακή ανάλυση μηχανισμών ανθεκτικότητας εντόμων  
υγειονομικής σημασίας και εχθρών καλλιεργειών στα εντομοκτόνα

**Αναστασία Α. Καμπουράκη**

Επιβλέπων καθηγητής:

Ιωάννης Βόντας, Καθηγητής ΓΠΑ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Ιωάννης Βόντας, Καθηγητής ΓΠΑ

Γεώργιος Κολιόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Εμμανουήλ Ροδιτάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΛΜΕΠΑ

**ΑΘΗΝΑ  
2021**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

**Διδακτορική Διατριβή**

Μοριακή ανάλυση μηχανισμών ανθεκτικότητας εντόμων υγειονομικής σημασίας και εχθρών καλλιεργειών στα εντομοκτόνα

“Molecular analysis of insecticide resistance mechanisms in pests of public health and agricultural interest”

**Αναστασία Α. Καμπουράκη**

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Ιωάννης Βόντας, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Γεώργιος Κολιόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Εμμανουήλ Ροδιτάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΛΜΕΠΑ

Γεώργιος Μπρούφας, Καθηγητής, ΔΠΘ

Διονύσιος Περδίκης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Γεώργιος Σκάβδης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΔΠΘ

Αναστασία Τσαγκαράκου, Ερευνήτρια Α' ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ

## Μοριακή ανάλυση μηχανισμών ανθεκτικότητας εντόμων υγειονομικής σημασίας και εχθρών καλλιεργειών στα εντομοκτόνα

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής  
Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας

### Περίληψη

Ένας μεγάλος αριθμός εντόμων απειλεί τους τομείς της αγροτικής παραγωγής, προκαλώντας σημαντικές απώλειες των γεωργικών προϊόντων ετησίως, και της δημόσιας υγείας, μέσω ασθενειών που μεταδίδονται από φορείς. Η καταπολέμησή τους βασίζεται κυρίως στη χρήση χημικών εντομοκτόνων, όμως η πίεση επιλογής που υφίστανται, συχνά οδηγεί στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας.

Ένας πολύ σημαντικός γεωργικός εχθρός είναι ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, ο οποίος προκαλεί πολύ σοβαρές ποιοτικές και ποσοτικές ζημιές στην ελαιοπαραγωγή, εάν δεν τεθεί υπό έλεγχο. Τα κουνούπια αποτελούν μία ομάδα εντόμων υγειονομικής σημασίας, η οποία ευθύνεται για τη μετάδοση πολύ σοβαρών ασθενειών όπως η ελονοσία, ο δάγκειος πυρετός, ο ιός του Δυτικού Νείλου κ.α.. Ο έλεγχος των ασθενειών που μεταδίδονται από κουνούπια στηρίζεται κυρίως στον έλεγχο του φορέα. Η καταπολέμηση του δάκου της ελιάς και των κουνουπιών στηρίζεται κυρίως στη χρήση εντομοκτόνων. Εν τούτοις, η συχνή και εκτεταμένη χρήση περιορισμένου αριθμού διαθέσιμων εντομοκτόνων έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας, και στις δύο περιπτώσεις, υπονομεύοντας την αποτελεσματικότητα των επεμβάσεων καταπολέμησης. Η μελέτη των μηχανισμών ανθεκτικότητας και η παρακολούθηση της εξέλιξής της στους πληθυσμούς, αποτελούν πολύ σημαντικά στοιχεία της διαχείρισής της και κατ' επέκταση της διαφύλαξης της αποτελεσματικότητας των εντομοκτόνων.

Σε αυτή την κατεύθυνση, στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε παρακολούθηση της κατάστασης και της εξέλιξης της ανθεκτικότητας ελληνικών πληθυσμών του δάκου της ελιάς στις κύριες ομάδες εντομοκτόνων που χρησιμοποιούνται τα τελευταία χρόνια για την καταπολέμησή του (οργανοφωσφορικά, πυρεθροειδή, σπινουσίνες). Με κλασσικές εργαστηριακές βιοδοκιμές τοξικότητας ελέγχθηκαν τα επίπεδα ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα alpha-cypermethrin και spinosad, τα οποία βρέθηκαν αρκετά αυξημένα στην περίπτωση του alpha-cypermethrin. Με βιοδοκιμές που έλαβαν χώρα στον αγρό, επιβεβαιώθηκε η μειωμένη αποτελεσματικότητα στο alpha-cypermethrin και σε πραγματικές συνθήκες πεδίου, η οποία είχε προηγουμένως παρατηρηθεί με κλασσικές εργαστηριακές βιοδοκιμές. Τέλος, η εφαρμογή μοριακών διαγνωστικών μεθόδων για τον έλεγχο της συχνότητας γνωστών μεταλλαγών ανθεκτικότητας του δάκου στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, έδειξε ότι οι μεταλλαγές G488S και I214V στο γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης είναι εγκαθιδρυμένες στους περισσότερους πληθυσμούς, ενώ η Δ3Q έλλειψη βρέθηκε σε πολύ χαμηλές συχνότητες.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση του μηχανισμού ανθεκτικότητας του δάκου στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα. Βιοδοκιμές τοξικότητας με το εντομοκτόνο alpha-cypermethrin και τον αναστολέα δράσης P450 μονοξυγενασών (PBO) έδειξαν την εμπλοκή των P450 μονοξυγενασών στην ανθεκτικότητα στο alpha-cypermethrin. Έπειτα, από ανάλυση μεταγραφώματος, προέκυψε ένας αριθμός γονιδίων αποτοξικοποίησης που υπερεκφράζονται σε ανθεκτικούς πληθυσμούς σε σχέση με ευαίσθητους, εκ των οποίων το μεγαλύτερο ποσοστό ήταν μέλη της ομάδας των P450 μονοξυγενασών. Για δύο από αυτές (CYP6A23, CYP6G2), έγινε διερεύνηση του λειτουργικού τους ρόλου με χρήση της τεχνολογίας της RNA παρεμβολής. Η μείωση

της έκφρασής της CYP6A23 απέδωσε περισσότερη ευαισθησία στο εντομοκτόνο alpha-cypermethrin, ενώ στην περίπτωση της CYP6G2 δεν υπήρξε κάποια αλλαγή.

Επιπροσθέτως, διερευνήθηκε ο μηχανισμός της ανθεκτικότητας διείσδυσης στο κουνούπι *Anopheles gambiae*, το οποίο αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους φορείς της ελονοσίας παγκοσμίως. Υπολογίστηκε ο ρυθμός διείσδυσης του πυρεθροειδούς εντομοκτόνου deltamethrin σε ανθεκτικά κουνούπια, όπου βρέθηκε μειωμένος, σε σχέση με ευαίσθητα. Ποσοτική ανάλυση των υδρογονανθράκων του επιδερμιδίου σε ολόκληρα σώματα και σε πόδια ανθεκτικών κουνουπιών σε σχέση με ευαίσθητα, υπέδειξε διαφορές στη σύνθεση του επιδερμιδίου, φανερώνοντας συσχέτιση με την ανθεκτικότητα διείσδυσης των εντομοκτόνων στο *Anopheles gambiae*.

Επιπλέον, εκτίμηση της πληθυσμιακής σύστασης και ανθεκτικότητας σε πληθυσμούς κουνουπιών-φορέων ασθενειών, πραγματοποιήθηκε στο νησί της Κρήτης. Με βάση μορφολογική αναγνώριση και μοριακή ταυτοποίηση, βρέθηκε ότι η πληθυσμιακή κοινότητα των κουνουπιών της Κρήτης περιλαμβάνει σημαντικούς φορείς ασθενειών, με το είδος *Culex pipiens* (κύριος φορέας του ιού του Δυτικού Νείλου) να κυριαρχεί. Η εφαρμογή μοριακών διαγνωστικών μεθόδων για τον έλεγχο της παρουσίας μεταλλαγών ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα και στο ρυθμιστή ανάπτυξης diflubenzuron, έδειξαν ότι οι γνωστές μεταλλαγές ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα βρίσκονται σε υψηλές συχνότητες στους πληθυσμούς *Cx. pipiens*, και σε χαμηλές έως μέτριες συχνότητες στους πληθυσμούς *Aedes albopictus*. Η μεταλλαγή I1043M ανθεκτικότητας στο diflubenzuron, αν και σε μικρό ποσοστό, ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά σε άτομα του είδους *Cx. pipiens* από το Λασίθι.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής έδειξαν ότι η ανθεκτικότητα στους πληθυσμούς του δάκου στο πυρεθροειδές εντομοκτόνο alpha-cypermethrin και στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα έχει εξελιχθεί στην Ελλάδα. Η ανθεκτικότητα του δάκου στο alpha-cypermethrin έχει αρνητικό αντίκτυπο στις εφαρμογές στο πεδίο, ενώ στο μηχανισμό ανθεκτικότητας εμπλέκονται οι P450 μονοοξυγενάσες. Ο μηχανισμός της επιδερμικής ανθεκτικότητας (μειωμένης διείσδυσης εντομοκτόνων) είναι υπαρκτός στον φορέα της ελονοσίας *An. gambiae*, και βασίζεται σε αλλαγές στη σύσταση του επιδερμιδίου, όπως την αυξημένη εναπόθεση υδρογονανθράκων. Τέλος, η πληθυσμιακή σύνθεση των κουνουπιών της Κρήτης περιλαμβάνει σημαντικούς φορείς ασθενειών, οι οποίοι σε ένα μεγάλο ποσοστό φέρουν μεταλλαγές ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα, και επιπλέον ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά σε άτομα *Culex pipiens* μία από τις μεταλλαγές ανθεκτικότητας στο diflubenzuron.

**Επιστημονική περιοχή:** Ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα

**Λέξεις κλειδιά:** εντομοκτόνα, ανθεκτικότητα, δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, κουνούπια

## Molecular analysis of insecticide resistance mechanisms in pests of public health and agricultural interest

Department of Crop Science  
Laboratory of Agricultural Pharmacology

### Abstract

A number of insects pose a threat in agricultural production, as they cause significant crop losses annually as well as, they threaten public health by transmitting vector-borne diseases. Insect control is undertaken via the use of chemical insecticides, where selection pressure often results to insecticide resistance emergence.

A major agricultural pest is the olive fly, *Bactrocera oleae*, producing serious qualitative and quantitative losses in olive production. Mosquitoes comprise a group of insects that threaten public health as they are responsible for the transmission of severe diseases like malaria, Dengue fever and West Nile virus. The prevention of these diseases is primarily based on the control of the mosquito-vectors. Olive flies and mosquitoes are mainly controlled by the use of insecticides. Nevertheless, the frequent and extensive use of a limited number of insecticides has led to the development of insecticide resistance, thus eroding the efficacy of control applications. Resistance monitoring and investigation of the underlying molecular mechanisms are major components of insecticide resistance management, thus preserving the insecticides' efficacy as well.

In this direction, the status and evolution of resistance in major classes of insecticides used in the main control programs (organophosphates, pyrethroids, spinosyns) were monitored, in olive fly populations from Greece. Using topical toxicity bioassays, the levels of resistance in alpha-cypermethrin and spinosad were assessed, and reduced efficacy of alpha-cypermethrin was evident. Field bioassays results were in agreement with laboratory bioassays. Furthermore, molecular diagnostics were applied for the detection of organophosphate resistance mutation, and the results showed that in acetyl-cholinesterase (AChE), the known target-site mutations (G488S and I214V) are fixed in most populations tested, but the  $\Delta$ 3Q deletion was found in very low frequencies.

In addition, the molecular mechanism of pyrethroid resistance was investigated in the olive fly. Toxicity bioassays with alpha-cypermethrin and a known P450 monooxygenase inhibitor (PBO) indicated the involvement of P450s in resistance to alpha-cypermethrin. Furthermore, transcriptomic analyses revealed a number of detoxification being overexpressed in resistant populations, when compared to susceptible ones, with the majority of them belonging to the P450 group of enzymes. Two of those P450s (CYP6A23, CYP6G2) were functionally validated using the RNA interference technology. The reduction of CYP6A23 expression levels led to an increase of sensitivity to alpha-cypermethrin, but in the case of CYP6G2, no changes were observed.

The molecular mechanism of cuticular/penetration resistance in the major malaria vector, *Anopheles gambiae*, were also investigated. Penetration rate of the pyrethroid insecticide deltamethrin was evaluated, in resistant mosquitoes when compared with susceptible ones, where reduction of the insecticides' penetration was observed. Quantitative analysis of the cuticular hydrocarbons in hole bodies and legs of resistant mosquitoes versus susceptible mosquitoes was performed, where differences in

cuticular composition were depicted, indicating an adaptation contributing in insecticide resistance.

Finally, the populational composition and the insecticide resistance status in mosquito-vector populations from the island of Crete, was monitored. Based on morphological and molecular identification, the mosquito fauna of Crete comprises of several vectors of serious diseases, with *Culex pipiens* (major vector of West Nile virus), by far being the most dominant species across the island. Molecular diagnostics were applied for the detection of pyrethroid and diflubenzuron resistance mutations. *Cx. pipiens* and *Aedes albopictus* mosquitoes both harboured mutations associated with pyrethroid resistance, with *Cx. pipiens* having high frequencies while *A. albopictus* maintaining low to moderate frequencies. In addition, the diflubenzuron resistance mutation, I1043M, was detected in low frequency, but for the first time, in a *Cx. pipiens* population from Lassithi.

In conclusion, the results of the present study showed that resistance in the populations of olive fruit fly to the pyrethroid insecticide alpha-cypermethrin and to organophosphate insecticides has evolved in Greece. Resistance of the olive fruit fly to alpha-cypermethrin has a negative impact on field applications, and P450 monooxygenases are involved in the resistance mechanism. The mechanism of cuticular/penetration resistance (reduced insecticide penetration) is present in the malaria vector *An. gambiae*, and is based on changes in epidermis composition, such as increased deposition of hydrocarbons. Finally, the population composition of mosquitoes in Crete includes important disease vectors, which in a large proportion carry resistance mutations to pyrethroid insecticides, and in addition, one of the resistance mutations to diflubenzuron was detected for the first time in *Cx. pipiens* individuals.

**Scientific field:** Insecticide resistance

**Keywords:** insecticides, resistance, olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, mosquitoes

## Ευχαριστίες

Η ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής είναι το αποτέλεσμα μακράς προσπάθειας, κατά την οποία η συμβολή αρκετών ανθρώπων ήταν σημαντική και σε κάποιες περιπτώσεις καθοριστική.

Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω εκ βαθέων τον επιβλέπων καθηγητή μου κ. Βόντα Γιάννη, ο οποίος αναμφισβήτητα μου έδωσε τη μεγαλύτερη παρότρυνση για την έναρξη και την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής. Ήταν ο άνθρωπος που με εισήγαγε με το δικό του τρόπο στον κόσμο των εντόμων, και μου έδινε διαρκώς, τόσο το κίνητρο, όσο και την ευκαιρία να πηγαίνω ένα βήμα παραπάνω τη φορά. Με συμβούλευε καθ' όλη τη διάρκεια, επιστημονικά και ψυχολογικά, με υπομονή και κατανόηση. Δεν μπορώ να μην αναφέρω ακόμα την αμέριστη υποστήριξή του σε κάθε επίπεδο, από την πρώτη μέρα που του ανακοίνωσα ότι θα γίνω μητέρα, εν μέσω της διατριβής μου, η οποία ήταν καθοριστική ώστε να καταφέρω να τελειώσω την εργασία αυτή.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Ροδιτάκη και την κα Τσαγκαράκου που εκτός από μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής και της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής μου αντίστοιχα, μου πρόσφεραν πολύτιμες συμβουλές και συζητήσεις σε όλη μου την πορεία έως τώρα. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον κ. Κολιόπουλο ως μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής μου, για τις εύστοχες παρατηρήσεις του. Ως μέλος της τριμελούς επιτροπής μου πριν αντικατασταθεί, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κα Φλουρή Φωτεινή. Τον κ. Περδίκη, τον κ. Σκάβδη και τον κ. Μπρούφα ως μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής μου, και για τα πολύ εύστοχα σχόλιά τους.

Από το εργαστήριο του Γ.Π.Α. ευχαριστώ θερμά όλα τα παιδιά που συνεργαστήκαμε, την Εύα Κάτσαβου, το Σπύρο Βλογιαννίτη, τον Ηλία Κιούλο. Είμαι ευγνώμων που συνεργάστηκα στενά με το Μαξ Φωτακη, ο οποίος με τόση γενναιοδωρία με βοήθησε. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ευαγγελία Μώρου για τη συνεργασία που έχουμε όλα αυτά τα χρόνια, τη στήριξη, τη βοήθεια στα διαχειριστικά και οικονομικά, τις ατελείωτες συζητήσεις.

Από το εργαστήριο του IMBB ευχαριστώ έναν-έναν ξεχωριστά για την καλή συνεργασία τους. Τη Βασιλεία Μπαλαμπανίδου, που αν μη τι άλλο με εμπιστεύθηκε, είχαμε μία πολύ ομαλή και παραγωγική συνεργασία, με παρότρυνε συνεχώς ως την τελευταία στιγμή. Τον Πάνο Ιωαννίδη, για την άψογη συνεργασία, τις συμβουλές και την καλή του διάθεση, τη Μαίρη Κέφη, που ήταν πάντα πρόθυμη να με εξυπηρετήσει και να με συμβουλέψει, τη Σοφία Μπαλάσκα για τη συνεργασία και τη βοήθεια, τον Ιάσωνα Χαράμη για τη συνεργασία, την Αμαλία Ανθούση που μας ξαναγύρισε και πολύ χαρήκαμε, το Γιώργο Σαμαντζίδη μας, την Εύα Σκούφα, τη Ραφαέλα Παντελέρη, τη Σοφία Καφόρου, τη Λίντα Γρηγοράκη και το Βασίλη Δουρή. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον κ. Γιάννη Λειβαδάρα για όλη την αλληλεπίδραση όλα αυτά τα χρόνια, στα θέματα των εκτροφών και για την παροχή βιολογικού υλικού.

Από το εργαστήριο του UOC, ευχαριστώ όλους τους ανθρώπους που συνυπήρξαμε. Όμως θα ήθελα να αναφέρω εκείνους που ήταν πάντα εκεί για να με βοηθήσουν τα τελευταία χρόνια, να ακούσουν, να με βγάλουν από τη δύσκολη θέση και να με συμβουλέψουν. Τη Δήμητρα Τσακιρέλη, για τις κάθε είδους συζητήσεις, για την υποστήριξη μέχρι την τελευταία στιγμή και την καθημερινή πινελιά τρέλας, τάξης και χιούμορ. Την Κέλλυ Παπαποστόλου, για τα πρωινά μας, τη βοήθεια ως το τέλος και φυσικά για τις διορθώσεις των αγγλικών μου. Τον Κώστα Μαυρίδη, που ήταν πάντα εκεί να απαντήσει σε ερωτήματα κάθε είδους, και είναι ο άνθρωπος που τον εμπιστεύεσαι τυφλά. Τη Μαρία Ρήγα για τα σύντομα διαλείμματα, για τη συμβολή και τη βοήθεια της σε διάφορες φάσεις της διατριβής, η οποία ήταν αδιαμφισβήτητα πολύ σημαντική.

Θα ήθελα επίσης να αναφέρω τα παιδιά που πέρασαν από το εντομοτροφείο και έκαναν τις ατελείωτες ώρες να περνούν πιο ευχάριστα. Ιδιαίτερα τη Σταυρινή Παπαδάκη για τις κάθε είδους συζητήσεις, και το Χρίστο Θεμιστοκλέους για την καλή διάθεση.

Από το ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Άρη Ηλία που ήταν εκεί και πάντα, να συμβουλέψει για οποιασδήποτε φύσεως πρόβλημα και τη Μαριάννα Σταυρακάκη για την άψογη συνεργασία.

Δεν μπορώ να μην αναφέρω όλους τους συνεργάτες μας από τις Διευθύνσεις Αγροτικής Οικονομίας και Κτηνιατρικής για την αποστολή των δειγμάτων, και ιδιαίτερα την κα Καραταράκη Αγγελική, και τον κ. Κατσικογιάννη Γιώργο και την κα Μαλανδράκη Ελένη, οι οποίοι ήταν ο συνδετικός μου κρίκος με το πεδίο και την πραγματικότητα της κατάστασης στη δακοκτονία και κατέβαλαν κάθε προσπάθεια για να καλύψουν τις απαιτήσεις μου σε βιολογικό υλικό δάκου.

Επιπλέον, θα ήθελα να αναφέρω και τους ανθρώπους εκτός του δικού μας εργαστηρίου, για την ανταλλαγή απόψεων, αναλωσίμων και τεχνικών γνώσεων, τη Ρίτα Μέρμηγκα, τη Νικολέτα Κρυσοβρυσανάκη, το Γιάννη Βλατάκη, τον Τάσο Αλεξιάδη, τη Βίλλυ Μιχαλοπούλου και τη Αιμιλία Γρυπιώτη.

Δεν μπορώ να μην αναφερθώ στους ανθρώπους που συμμετείχαν εκτός εργαστηρίου, οι οποίοι δεν είναι λίγοι, και με στήριξαν και με παρότρυναν, ο καθένας με το δικό του τρόπο, είτε δια ζώσης είτε τηλεφωνικά, τους φίλους μου από το Γ.Π.Α. και τους φίλους μου από το Ηράκλειο.

Τη μεγαλύτερη ευγνωμοσύνη χρωστάω στην οικογένειά μου, τη στενότερη και την ευρύτερη, που πάντα είχα τη στήριξη και την κατανόησή τους, αλλά ενίοτε και την παροχή βιολογικού υλικού. Οι γονείς μου ήταν πάντα εκεί, ένα τεράστιο στήριγμα για εμένα, με την αμέριστη εμπιστοσύνη που έδειξαν σε όλες τις επιλογές μου, και την ουσιαστική και πρακτική βοήθεια τους, ο καθένας με το δικό του τρόπο ώστε να ολοκληρωθεί αυτό το έργο.

Κλείνοντας, θα ήθελα να αναφέρω τους ανθρώπους της ζωής μου, το Θανάση και την Αγγελική μας, οι οποίοι ήταν κάθε στιγμή το κίνητρό και η δύναμή μου, και επέδειξαν απεριόριστη υπομονή, κατανόηση και συμπάρασταση, καταβάλλοντας καθημερινά τη δική τους προσωπική προσπάθεια, έως το τέλος.

Η ερευνητική εργασία υποστηρίχτηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛΙΔΕΚ) και από τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας (ΓΓΕΤ), στο πλαίσιο της Δράσης «Υποτροφίες ΕΛΙΔΕΚ Υποψηφίων Διδακτόρων»

«Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της»



# Περιεχόμενα

<b>Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή.....</b>	<b>1</b>
1.1 Ο δάκος της ελιάς, <i>Bactrocera oleae</i> (Rossi, 1790) .....	3
1.1.1 Περιγραφή.....	3
1.1.2 Η σημασία του δάκου ως εχθρός της ελιάς .....	5
1.1.3 Καταπολέμηση του δάκου της ελιάς .....	7
1.1.3.1 Μη-χημική καταπολέμηση .....	8
1.1.3.2 Χημική καταπολέμηση.....	12
1.2 Κουνούπια-φορείς ασθενειών .....	15
1.2.1 Περιγραφή.....	15
1.2.2 Υγειονομική σημασία των κουνουπιών και όχληση.....	18
1.2.3 Καταπολέμηση των κουνουπιών.....	23
1.2.3.1 Μη-χημική καταπολέμηση .....	24
1.2.3.2 Χημική καταπολέμηση.....	26
1.2.4.1 Τρόποι εφαρμογής χημικής καταπολέμησης.....	26
1.2.4.2 Εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται .....	27
1.3 Ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα.....	30
1.3.1 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας.....	31
1.3.2 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα.....	35
1.3.3 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα .....	37
1.3.4 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας στους ρυθμιστές ανάπτυξης (diflubenzuron) ...	38
1.3.5 Διαχείριση ανθεκτικότητας.....	38
1.3.5.1 Μέθοδοι παρακολούθησης της ανθεκτικότητας.....	40
1.3.5.2 Μέθοδοι διερεύνησης των μηχανισμών ανθεκτικότητας .....	41
1.4 Αντικείμενο της εργασίας .....	42
<b>Κεφάλαιο 2: Ανθεκτικότητα του δάκου στα εντομοκτόνα: εξέλιξη φαινομένου στην Ελλάδα και η επίδρασή της στην αποτελεσματικότητα των ψεκασμών. .</b>	<b>44</b>
2.1 Εισαγωγή.....	45
2.2 Υλικά και μέθοδοι .....	47
2.2.1 Πληθυσμοί δάκου (και ιστορικό των ψεκασμών τους) .....	47
2.2.2 Εργαστηριακές βιοδοκιμές τοξικότητας τοπικής εφαρμογής.....	50
2.2.3 Βιοδοκιμές σε κλουβιά στον ελαιώνα.....	51
2.2.4 Απομόνωση γενωματικού DNA και εφαρμογή μοριακών διαγνωστικών μεθόδων .....	54
2.3 Αποτελέσματα.....	56
2.3.1 Ιστορικό εφαρμογής ψεκασμών στους πληθυσμούς που ελέγχθηκαν.....	56
2.3.2 Η κατάσταση και η τελευταία εξέλιξη της ανθεκτικότητας του δάκου στα εντομοκτόνα alpha-cypermethrin και spinosad .....	56
2.3.2 Επίδραση της ανθεκτικότητας στο alpha-cypermethrin στην αποτελεσματικότητα της εφαρμογής του στο πεδίο .....	59
2.3.3 Ανίχνευση των μεταλλαγών ανθεκτικότητας του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης, σε πληθυσμούς πεδίου.....	61
2.4 Συζήτηση .....	62
<b>Κεφάλαιο 3: Ανάλυση μηχανισμού ανθεκτικότητας του δάκου της ελιάς, <i>Bactrocera oleae</i>, στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα .....</b>	<b>65</b>
3.1 Εισαγωγή.....	66
3.2 Υλικά και Μέθοδοι .....	67
3.2.1 Πληθυσμοί δάκου .....	67
3.2.2 Εργαστηριακές βιοδοκιμές τοπικής εφαρμογής με το συνεργιστή Piperonyl butoxide (PBO).....	68
3.2.3 RNA αλληλούχηση.....	68

3.2.4 Απομόνωση RNA, σύνθεση cDNA (αντίστροφη μεταγραφή) και ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου.....	69
3.2.5 Γονιδιακή σίγηση με την τεχνολογία της RNA παρεμβολής (RNAi).....	71
3.3 Αποτελέσματα.....	72
3.3.1 Επίδραση του συνεργιστή PBO στην τοξικότητα του εντομοκτόνου alpha-cypermethrin.....	72
3.3.2 Αποτελέσματα RNA αλληλούχισης.....	73
3.3.3 Επιβεβαίωση της υπερέκφρασης των γονιδίων <i>CYP6A23</i> και <i>CYP6G2</i> σε άγριους πληθυσμούς δάκου.....	75
3.3.4 Λειτουργική ανάλυση του ρόλου των γονιδίων <i>CYP6A23</i> και <i>CYP6G2</i> .....	76
3.4 Συζήτηση.....	78
<b>Κεφάλαιο 4: Ανάλυση του μηχανισμού ανθεκτικότητας της επιδερμίδας στο φορέα της ελονοσίας <i>Anopheles gambiae</i>.....</b>	<b>81</b>
4.1 Εισαγωγή.....	82
4.2 Υλικά και μέθοδοι.....	86
4.2.1 Πληθυσμοί κουνουπιών <i>Anopheles gambiae</i> .....	86
4.2.2 Υπολογισμός ρυθμού διείσδυσης του ραδιοσημασμένου εντομοκτόνου <sup>14</sup> C deltamethrin.....	86
4.2.3 Απομόνωση λιπιδίων των κουνουπιών.....	87
4.3 Αποτελέσματα.....	88
4.3.1 Ρυθμός διείσδυσης του εντομοκτόνου deltamethrin.....	88
4.3.2 Ανάλυση υδρογονανθράκων.....	89
4.3.2.1 Ανάλυση συνολικών και επιδερμικών υδρογονανθράκων.....	89
4.3.2.2 Ανάλυση επιδερμικών υδρογονανθράκων ποδιών και ολόκληρου σώματος.....	90
4.3 Συζήτηση.....	91
<b>Κεφάλαιο 5: Παρακολούθηση της πληθυσμιακής σύστασης, της δυναμικής και της ανθεκτικότητας σε πληθυσμούς κουνουπιών από την Κρήτη.....</b>	<b>95</b>
5.1 Εισαγωγή.....	96
5.2 Υλικά και μέθοδοι.....	99
5.2.1 Δείγματα κουνουπιών και μορφολογική αναγνώριση.....	99
5.2.2 Απομόνωση γενωματικού DNA και εφαρμογή μοριακών διαγνωστικών μεθόδων.....	100
5.3 Αποτελέσματα.....	103
5.3.1 Πληθυσμιακή σύσταση και δυναμική των κουνουπιών.....	103
5.3.2 Ανθεκτικότητα των κουνουπιών-φορέων στα εντομοκτόνα.....	107
5.3 Συζήτηση.....	109
<b>Κεφάλαιο 6: Γενική Συζήτηση.....</b>	<b>113</b>
6.1 Σύνοψη και μελλοντικές ερευνητικές κατευθύνσεις.....	114
6.2 Προτάσεις για τα διαθέσιμα εργαλεία παρακολούθησης της ανθεκτικότητας.....	118
<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>121</b>

# Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

Τα Έντομα αποτελούν την πολυπληθέστερη κλάση του φύλου Αρθρόποδα (>80% των Αρθροπόδων είναι Έντομα), και περιλαμβάνουν πάνω από 1 εκατ. καταγεγραμμένα είδη, όμως ο πραγματικός αριθμός τους υπολογίζεται να είναι πολύ μεγαλύτερος (ανασκόπηση από Stork 2018). Αναμφισβήτητα, η παρουσία των εντόμων στα οικοσυστήματα είναι ζωτικής σημασίας για τον άνθρωπο, παρέχοντας πολύτιμες υπηρεσίες και αγαθά (ανακύκλωση θρεπτικών συστατικών, επικονίαση, διατροφικά προϊόντα, κ.α.) (Bélanger and Pilling, 2019; Ollerton et al., 2011; Yang and Gratton, 2014). Όμως, ταυτόχρονα, ένας μεγάλος αριθμός εντόμων αποτελεί τεράστια απειλή για τον άνθρωπο, στον τομέα της δημόσιας υγείας και της αγροτικής παραγωγής.

Οι ασθένειες που μεταδίδονται από έντομα-φορείς προκαλούν τεράστια προβλήματα στη δημόσια υγεία παγκοσμίως, με περισσότερους από 3 δις ανθρώπους να βρίσκονται σε κίνδυνο παραλυτικών και θανατηφόρων ασθενειών (WHO, 2020a). Η ελονοσία, η οποία μεταδίδεται από είδη του γένους *Anopheles*, αποτελεί μία από τις πιο σοβαρές εντομο-μεταδιδόμενες ασθένειες η οποία προκαλεί παγκοσμίως πάνω από 200 εκατ. περιστατικά και περισσότερους από 400.000 θανάτους ετησίως (WHO, 2020a). Επιπλέον, η βιωσιμότητα της αγροτικής παραγωγής, η οποία χρειάζεται σχεδόν να διπλασιαστεί κατά τα επόμενα 30 έτη, ώστε να διατηρηθεί η επάρκεια τροφίμων για την κάλυψη της αύξησης του πληθυσμού του πλανήτη μας (FAO, 2009), απειλείται σημαντικά από τους γεωργικούς εχθρούς. Υπολογίζεται ότι οι γεωργικοί εχθροί καταστρέφουν το 18-26 % της παγκόσμιας αγροτικής παραγωγής ετησίως (Culliney, 2014).

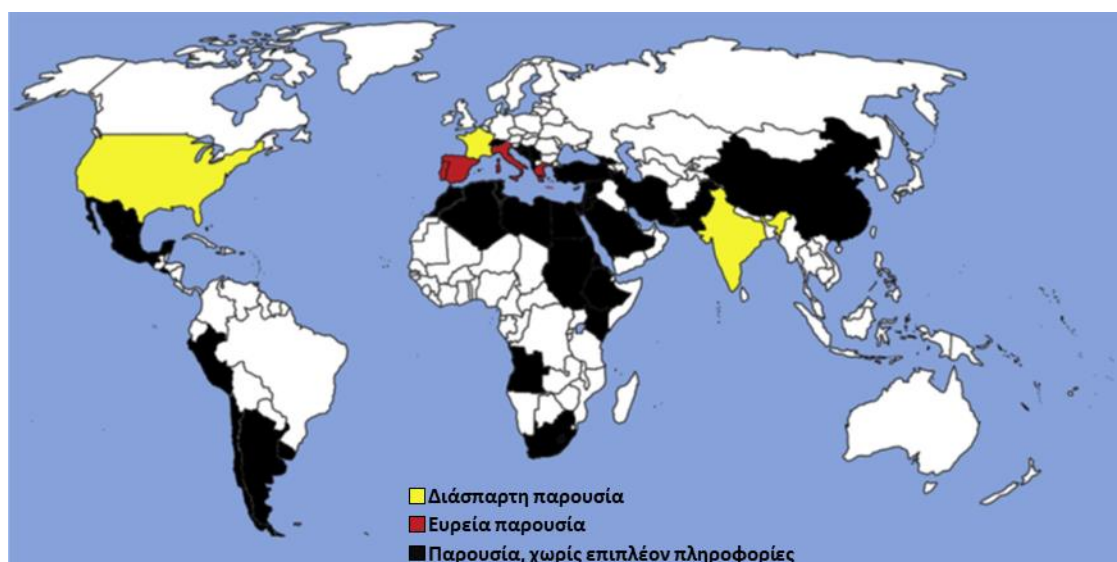
Η πρόληψη των ασθενειών που μεταδίδονται από φορείς και η προστασία της αγροτικής παραγωγής επιτυγχάνεται κυρίως με τον έλεγχο των πληθυσμών των εντόμων φορέων ή εχθρών, ο οποίος σε μεγάλο βαθμό βασίζεται στη χρήση εντομοκτόνων. Εν τούτοις, ο αριθμός των διαθέσιμων ομάδων εντομοκτόνων είναι περιορισμένος, ενώ παράλληλα η χρήση τους στην καταπολέμηση γεωργικών εχθρών και φορέων ασθενειών είναι συχνή και εκτεταμένη, με αποτέλεσμα η πίεση επιλογής να έχει οδηγήσει σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα είναι ευρέως εξαπλωμένη στους κύριους γεωργικούς εχθρούς και φορείς ασθενειών, με πάνω από 15.000 περιπτώσεις ανθεκτικότητας να έχουν καταγραφεί (APRD, 2021).

## 1.1 Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae* (Rossi, 1790)

### 1.1.1 Περιγραφή

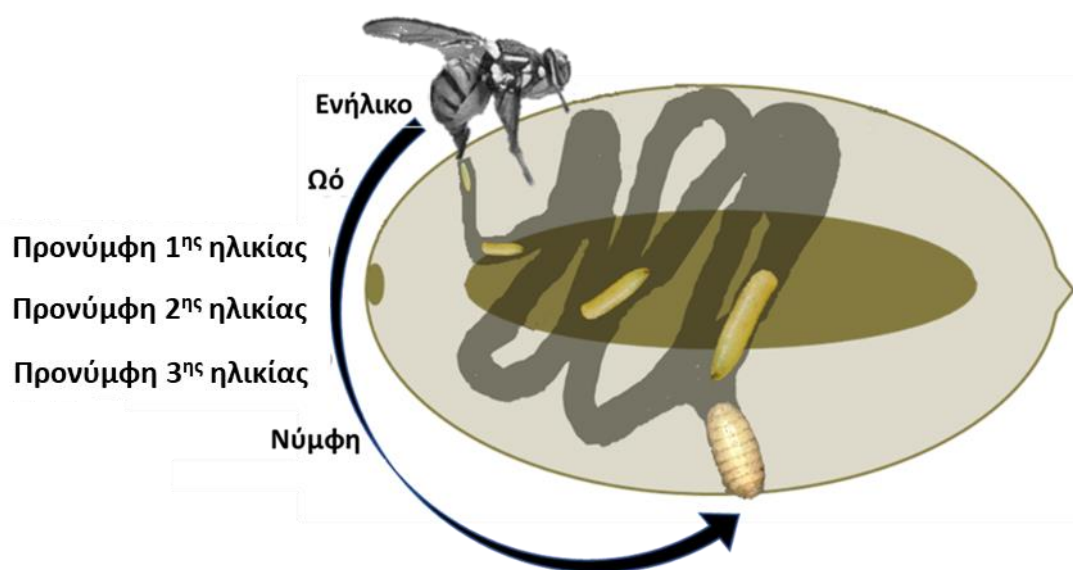
Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera (Daculus) oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae) είναι ο κυριότερος εχθρός της ελιάς. Η προνύμφη του, τρέφεται αποκλειστικά από τον καρπό της καλλιεργουμένης ελιάς ή αγριελιάς, γι' αυτό το λόγο συναντάμε το έντομο σχεδόν αποκλειστικά σε περιοχές με ελιές.

Η προέλευση του δάκου είναι από την κεντρική Αφρική, είναι άγνωστο πότε ακριβώς έφτασε στη Μεσόγειο αλλά πιθανότατα από αρχαιοτάτους χρόνους, όπως και η συστηματική καλλιέργειά της ελιάς (Nardi et al., 2005). Σήμερα, η παρουσία του δάκου της ελιάς στη Μεσόγειο είναι διάχυτη, δεδομένου ότι το 98% των καλλιεργήσιμων ελαιόδεντρων παγκοσμίως, βρίσκονται σε αυτήν την περιοχή. Ο εχθρός εντοπίζεται επίσης σε μεγάλο μέρος της Κεντρικής και Βόρειας Αφρικής, σε κάποιες περιοχές της Νότιας Αφρικής, στα Κανάρια νησιά, στη Μέση Ανατολή, σε περιοχές της Νότιας και Ανατολικής Ασίας, στην Καλιφόρνια και σε περιοχές της Κεντρικής και Νότιας Αμερικής (ανασκόπηση από Malheiro et al., 2015) (Εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1: Παγκόσμια εξάπλωση του δάκου της ελιάς (*Bactrocera oleae*) (Πηγή: Malheiro et al., 2015 – τροποποιημένη εικόνα)

Ο δάκος είναι ολομετάβολο έντομο και ολοκληρώνει το βιολογικό του κύκλο σε τέσσερα διακριτά αναπτυξιακά στάδια, το ωό, την προνύμφη, τη νύμφη και το ενήλικο (τέλειο). Το ωό έχει σχήμα επίμηκες, χρώμα λευκό, με διάμετρο 0,2 mm και μήκος 0,8 mm. Η προνύμφη είναι άποδη, υπόλευκη ή υποκίτρινη, με σκουρόχρωμα στοματικά άγκιστρα και το μήκος της φτάνει τα 8 mm. Η νύμφη είναι ελλειψοειδής, με χρώμα κίτρινο ή ανοιχτό καστανό και βρίσκεται κλειστή σε καλά χιτινισμένο νυμφικό περίβλημα (puparium) (Εικόνα 1.2).



**Εικόνα 1.2: Απεικόνιση του βιολογικού κύκλου του δάκου (*Bactrocera oleae*) εντός του καρπού της ελιάς.** Μετά την εναπόθεση του ωού από το ενήλικο μέσα στον καρπό, η προνύμφη αναπτύσσεται δημιουργώντας τις χαρακτηριστικές στοές, μέχρι το σχηματισμό της νύμφης.

Το ενήλικο θηλυκό εναποθέτει το ωό του στο επικάρπιο της ελιάς, σχίζοντας με τον ωοθέτη του το εξωκάρπιο. Αφού το ωό εκκολαφθεί, η προνύμφη τρέφεται στο μεσοκάρπιο, δημιουργώντας στοές όσο μετακινείται. Η προνύμφη διανύει τρεις προνυμφικές ηλικίες (1<sup>η</sup>, 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup>). Αφότου είναι έτοιμη για νύμφωση, η προνύμφη ανοίγει μία οπή εξόδου στο επικάρπιο της ελιάς και είτε πέφτει στο έδαφος για να νυμφωθεί εκεί, είτε νυμφώνεται μέσα στην ελιά (ανασκόπηση από Malheiro et al., 2015). Το νυμφικό στάδιο είναι ατροφικό και ακίνητο. Το ενήλικο τρέφεται από διάφορες πηγές οργανικών ουσιών μεταξύ των οποίων τα μελιτώματα εντόμων, νέκταρ, γύρη, φυτικές εκκρίσεις, εκκρίσεις πτηνών, βακτήρια και ζύμες (ανασκόπηση από Daane and Johnson, 2010).

Ο χρόνος ολοκλήρωσης του βιολογικού κύκλου του εντόμου και ο αριθμός των γενεών του ετησίως, εξαρτώνται από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος, τη σχετική υγρασία και το μικροκλίμα του φυλλώματος της ελιάς στο οποίο κινείται το έντομο. Τα όρια θερμοκρασίας μέσα στα οποία το ωό και η προνύμφη δύνανται να επιβιώνουν είναι περίπου 10 °C έως 32 °C, με τα ποσοστά θνησιμότητας να είναι υψηλά στις ακραίες θερμοκρασίες (Fletcher, 1989; Tsitsipis, 1977, 1980). Σε ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης, ο χρόνος από την ωοαπόθεση μέχρι την εκκόλαψη του ωού είναι συνήθως 1 ημέρα, η ανάπτυξη της προνύμφης διαρκεί 8 ημέρες, ενώ το νυμφικό στάδιο διαρκεί 9 ημέρες (Neuenschwander and Michelakis, 1979; Tsitsipis, 1977). Ο χρόνος ανάπτυξης της προνύμφης μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τις επικρατούσες συνθήκες, από 8 έως 37 ημέρες, ενώ της νύμφης από 9 έως 49 ημέρες (Tsitsipis, 1980)

Τα ενήλικα έντομα επιβιώνουν αρκετούς μήνες όταν είναι αναπαραγωγικά ανενεργά, ενώ ο χρόνος ζωής τους μειώνεται αρκετά σε περιόδους έντονης ωοαπόθεσης. Κατά μέσο όρο, ζουν περίπου 1-2 μήνες. Κάθε ενήλικο θηλυκό άτομο φέρει περίπου 300 ωά, και εναποθέτει ένα ωό σε κάθε καρπό και δίπλα του φερομόνη αποτροπής ωοτοκίας ώστε να αποτρέψει την εναπόθεση άλλων ωών στον ίδιο καρπό, και κατ' επέκταση την ανάπτυξη περισσότερων της μίας προνύμφης ανά καρπό (Fletcher, 1987). Η κινητικότητα του εντόμου δεν είναι τόσο μεγάλη όσο σε άλλα, πολυφάγα Dacinae όμως έχει καταγραφεί να διανύει αποστάσεις έως και 10km (Fletcher, 1987).

Στη Μεσόγειο, ο δάκος παρουσιάζει συνήθως 4-6 γενιές ετησίως, το πλήθος των οποίων εξαρτάται από τις κλιματολογικές συνθήκες, τη διαθεσιμότητα σε ελιές καθώς και τις ποικιλίες ελιάς της κάθε περιοχής (Karatos and Fletcher, 1984). Η εναπόθεση των πρώτων ωών ξεκινά τον Ιούλιο με Αύγουστο, όταν οι καρποί της ελιάς είναι έτοιμοι για ωοτοκία, δίνοντας την πρώτη γενιά ενηλίκων τον Αύγουστο με αρχές Σεπτέμβρη. Από τον Αύγουστο έως το Φλεβάρη εμφανίζονται 3-4 γενιές, ενώ από το Φλεβάρη έως τον Ιούλιο 1-3 γενιές.

### **1.1.2 Η σημασία του δάκου ως εχθρός της ελιάς**

Η τεράστια οικονομική ζημιά που προκαλεί ο δάκος ως εχθρός της ελιάς οφείλεται τόσο στη μονοφαγία της προνύμφης του όσο και στο σύντομο κύκλο ζωής του. Η δημιουργία του νύγματος ωοτοκίας (οπή εισόδου), η κατανάλωση της σάρκας του καρπού από την προνύμφη, η οπή εξόδου (Εικόνα 1.3) και οι πολλές γενιές ανά έτος

προκαλούν τη ζημιά στην παραγωγή του προϊόντος. Συνεργιστικά στην αρχική προσβολή δρουν και δευτερογενείς προσβολές από φυτοπαθογενείς παράγοντες, όπως είναι ο μύκητας της ανθράκωσης αλλά και άλλοι φυτοπαθογόνοι μικροοργανισμοί (Cacciola et al., 2012; Iannotta et al., 2007; Latinoní et al., 2013; Markakis et al., 2021)



**Εικόνα 1.3: Ελιές με προσβολή από δάκο της ελιάς (*Bactrocera oleae*).**

Η απώλεια στην παραγωγή σχετίζεται με την άμεση μείωση της παραγωγής των επιτραπέζιων ελιών ή του ελαιολάδου και με την υποβάθμιση της ποιότητας των προϊόντων αυτών. Η μείωση της ποσότητας των παραγόμενων προϊόντων οφείλεται στην κατανάλωση της σάρκας του καρπού από την προνύμφη και στην πτώση των καρπών από το ελαιόδεντρο. Στην Ιταλία, χρονιές με χαμηλή προσβολή καταγράφηκαν απώλειες 0,1-0,2 kg ανά δέντρο, λόγω του δάκου, ενώ χρονιές με υψηλή προσβολή οι απώλειες αυτές έφτασαν σχεδόν το 1,1 kg ανά δέντρο (Petacchi et al., 1994).

Στην περίπτωση των επιτραπέζιων ελιών, οι προσβεβλημένες ελιές, είτε θα πέσουν εμπορική κατηγορία λόγω των ελαττωμάτων που έχουν εμφανίσει από την προσβολή, είτε πολλές φορές δεν μπορούν να καταναλωθούν καθόλου, δεδομένου ότι απορρίπτονται στον ποιοτικό έλεγχο. Στην περίπτωση του ελαιολάδου, πέραν της μείωσης της ποσότητας του, υποβαθμίζεται και η ποιότητά του, επιδρώντας σε



διάφορες παραμέτρους που σχετίζονται με την ποιότητά και τη σύστασή του. Αυτές περιλαμβάνουν την αύξηση της περιεκτικότητάς του σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και του βαθμού υπεροξειδωσης, απώλειες σε χρωστικές ουσίες, στερόλες, τοκοφερόλες, φαινολικές ενώσεις και σε πτητικές ουσίες. Συνολικά, οι αλλαγές στη σύνθεση του ελαιολάδου υποβαθμίζουν τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες και μειώνουν τη χημική σταθερότητά του, και κατ' επέκταση το χρόνο ζωής του (ανασκόπηση από Malheiro et al., 2015).

Σε περιοχές όπου ο δάκος είναι εδραιωμένος, εάν δε εφαρμοστούν μέτρα αντιμετώπισης, οι απώλειες μπορούν να φτάσουν έως 80% στο ελαιόλαδο, και έως 100% στις επιτραπέζιες ελιές (ανασκόπηση από Daane and Johnson, 2010). Για παράδειγμα, το 2019 στην Κρήτη, οι κλιματολογικές συνθήκες συνέβαλλαν στο να παρουσιάσει ο δάκος πολύ έντονη προσβολή, η οποία με τη σειρά της συνέβαλε στην πολύ σοβαρή προσβολή από μυκητολογικές ασθένειες (Markakis et al., 2021). Για το ίδιο έτος, αν και δεν υπάρχουν ακόμα επίσημα στοιχεία, η ζημιά στην ελαιοκαλλιέργεια στην Κρήτη υπολογίζεται πάνω 80.000.000 ευρώ.

Ανεξάρτητα από το επίπεδό τους, οι ζημιές έχουν αντίκτυπο σε όλη την αλυσίδα παραγωγής της ελιάς, ξεκινώντας από τον παραγωγό, με μείωση του εισοδήματός του και αύξηση του κόστους αντιμετώπισης του εχθρού. Ακολουθούν οι επιδράσεις στη βιομηχανία, που περιλαμβάνουν την υποβάθμιση των προς διάθεση προϊόντων η οποία οδηγεί σε χαμηλότερο εισόδημα, και τέλος, στον τελικό αποδέκτη, τον καταναλωτή, στον οποίο φτάνουν προϊόντα χαμηλής ποιότητας που στερούνται των βέλτιστων θρεπτικών και ωφέλιμων ιδιοτήτων τους (ανασκόπηση από Malheiro et al., 2015).

### **1.1.3 Καταπολέμηση του δάκου της ελιάς**

Το μέγεθος των ζημιών από το δάκο είναι ζωτικής σημασίας για τις περιοχές με εκτεταμένη καλλιέργεια της ελιάς, όπως είναι η Μεσόγειος, αλλά και παγκοσμίως, δεδομένης της υψηλής θρεπτικής αξίας των επιτραπέζιων ελιών και του ελαιολάδου. Επομένως είναι αναγκαία η εφαρμογή μέτρων αντιμετώπισης του εχθρού. Ενώ η καταπολέμηση του δάκου βασίζεται έως σήμερα, κυρίως στη χρήση συνθετικών εντομοκτόνων (αναφέρονται αναλυτικά στο Κεφ. 1.1.4), τις τελευταίες δεκαετίες η επιστημονική έρευνα έχει στραφεί στην εύρεση εναλλακτικών μεθόδων καταπολέμησης όπως είναι η μαζική παγίδευση, οι συσκευές προσέλκυσης και

θανάτωσης, οι φυσικοί εχθροί, η τεχνική του στείρου εντόμου κ.α. Όπως και σε άλλες περιπτώσεις εχθρών γεωπονικού ενδιαφέροντος, η ιδέα της ολοκληρωμένης διαχείρισης και καταπολέμησης έχει αναπτυχθεί και υλοποιείται τα τελευταία χρόνια και στην περίπτωση του δάκου της ελιάς.

Η **ολοκληρωμένη διαχείριση και καταπολέμηση** (Integrated Pest Management, IPM) περιλαμβάνει τη συντονισμένη ενσωμάτωση όλων των διαθέσιμων μεθόδων καταπολέμησης με τον πιο οικονομικό και οικολογικό τρόπο ώστε οι πληθυσμοί του εχθρού να παραμένουν κάτω από το όριο της οικονομικής ζημιάς. Πέραν των κλασσικών μεθόδων καταπολέμησης, η ολοκληρωμένη διαχείριση περιλαμβάνει την επιλογή ανθεκτικών φυτικών στελεχών, την παρακολούθηση των πληθυσμών του εχθρού και του υπολογισμού της ζημιάς, την εφαρμογή κατάλληλων καλλιεργητικών πρακτικών και τη διατήρηση του συντηρητικού<sup>1</sup> βιολογικού ελέγχου στα βέλτιστα δυνατά επίπεδα (Allahyari et al., 2016; Bueno and Jones, 2002).

### 1.1.3.1 Μη-χημική καταπολέμηση

Η **μαζική παγίδευση**, όπως και η χρήση των **συσκευών προσέλκυσης και θανάτωσης**, βασίζονται στη χρήση παγίδων που περιέχουν προσελκυστικές ουσίες οι οποίες ελκύουν το έντομο οσφρητικά (ελκυστικά τροφής), οπτικά (ελκυστικά χρώματος), ή σεξουαλικά (ελκυστικά φύλου) (Εικόνα 1.4). Στα ελκυστικά τροφής που χρησιμοποιούνται ευρέως περιλαμβάνονται η μελάσσα, η υδρολυμένη πρωτεΐνη, τα αμμωνιακά άλατα, η μαγιά *Torula* κ.α. (Haniotakis et al., 1986; Katsoyannos and Koulioussis, 2001; Thomas and Mangan, 2005), τα οποία χρησιμοποιούνται σε διαλύματα νερού στη μαζική παγίδευση. Δεδομένου ότι ο δάκος ελκύεται από το κίτρινο χρώμα (Prokopy et al., 1975), οι κίτρινες κολλητικές παγίδες και οι παγίδες McPhail με κίτρινο χρώμα χρησιμοποιούνται ευρέως. Επίσης, η ανακάλυψη και σύνθεση φερομονικών ουσιών που παράγονται από τα ίδια τα έντομα για την προσέλκυση των συντρόφων τους (Baker et al., 1980; Haniotakis et al., 1986), οδήγησε στη χρήση αυτών των ουσιών στη μαζική παγίδευση, αυξάνοντας κατά πολύ την αποτελεσματικότητα των παγίδων. Πολύ συχνός στη μαζική παγίδευση είναι ο συνδυασμός των παραπάνω ελκυστικών ουσιών, ενώ στην περίπτωση των παγίδων προσέλκυσης και θανάτωσης συνδυάζονται ελκυστικά δολώματα με εντομοκτόνους παράγοντες που οδηγούν στη θανάτωση των εντόμων.

---

<sup>1</sup> Ο συντηρητικός βιολογικός έλεγχος περιλαμβάνει την εφαρμογή προσεγγίσεων, οι οποίες ενισχύουν την επιβίωση και τη φυσιολογική και συμπεριφορική απόδοση των φυσικών εχθρών, οδηγώντας έτσι σε καλύτερη αποτελεσματικότητά τους έναντι του εχθρού που στοχεύουμε (Barbosa 2003).

Οι παραπάνω μέθοδοι, αν και είναι πιο φιλικές προς το περιβάλλον σε σχέση με άλλες μεθόδους, και αποτελεσματικές σε μικρής κλίμακας προσβολές, εντούτοις, υστερούν στην αποτελεσματικότητα σε περιπτώσεις έντονων προσβολών. Υπάρχουν στο εμπόριο τύποι παγίδων που μπορούν να συμβάλλουν δυναμικά στην καταπολέμηση του δάκου σε πιο έντονες προσβολές, όμως το κόστος μίας τέτοιας διαχείρισης, στις περισσότερες περιπτώσεις, μπορεί να είναι απαγορευτικό για τον παραγωγό. Επιπλέον, οι παραπάνω μέθοδοι μειονεκτούν στο γεγονός ότι παγιδεύουν παράλληλα πολλά ωφέλιμα έντομα και φυσικούς εχθρούς.

Ο **βιολογικός έλεγχος** βασίζεται στη χρήση φυσικών εχθρών για τον έλεγχο του εχθρού, με την εισαγωγή και εγκατάστασή τους σε μία καλλιέργεια ή περιοχή. Στους φυσικούς εχθρούς του δάκου κατατάσσεται μία μεγάλη λίστα από παρασιτοειδή, θηρευτές και παθογόνους μικροοργανισμούς (Albertini et al., 2017; Hoelmer et al., 2011; Torrini et al., 2020). Υπάρχουν σκευάσματα μικροοργανισμών όπως το βακτήριο *Bacillus thuringiensis* και ο μύκητας *Beauveria bassiana* που χρησιμοποιούνται στα πλαίσια του βιολογικού ελέγχου, ενώ παράλληλα έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες με τη χρήση παρασιτοειδών.

Από τα παρασιτοειδή, το είδος *Psytalia concolor*, το οποίο έχει μελετηθεί αρκετά, έχει χρησιμοποιηθεί στη μεγαλύτερης κλίμακας εφαρμογή έως τώρα, από τους Monastero & Delanoue το 1966, στο νησί Λίπαρι της Νότιας Ιταλίας. Πάνω από 8 εκατ. έντομα απελευθερώθηκαν για την προστασία 250.000 δέντρων. Η προσπάθεια ήταν επιτυχής ως προς την επίδραση στο δάκο (αυξήθηκε ο παρασιτισμός) και την ανάκαμψη των πληθυσμών των παρασιτοειδών μετά τη μαζική απελευθέρωσή τους, όμως διήρκησε μόνο κατά τη διάρκεια της απελευθέρωσης των παρασιτοειδών, ο πληθυσμός τους δεν εγκαταστάθηκε (Monastero and Delanoue, 1966). Στην Ελλάδα έχει πραγματοποιηθεί μία προσπάθεια εγκατάστασης του *Psytalia concolor* στο νησί της Χάλκης, όπου περίπου 25.000 άτομα απελευθερώθηκαν το 1965 (Stavraki-Pauloroulou and Sciences, 1965). Το παρασιτοειδές εγκαταστάθηκε και ο ρυθμός παρασιτισμού έφτασε περίπου το 50% μέχρι το τέλος της περιόδου, όμως τα επόμενα έτη έπεσε στο 1-2%. Επίσης, δύο επιπλέον προσπάθειες πραγματοποιήθηκαν στην ηπειρωτική Ελλάδα και στο νησί της Κέρκυρας την άνοιξη του 1976 (Karpatos et al., 1977; Liaropoulos et al., 1977), όπου στην ηπειρωτική Ελλάδα ο παρασιτισμός έφτασε το 51%, ενώ στην Κέρκυρα, ο ρυθμός παρασιτισμού από την πρώτη εβδομάδα μετά την απελευθέρωση ήταν στο 30-50%. Επιπλέον, κατά το 1979-1980, πραγματοποιήθηκε μίας μεγάλης κλίμακας απελευθέρωση στην ηπειρωτική Ελλάδα (Manikas and Tsiroyannis, 1982), με την απελευθέρωση περίπου 1,6 εκατ. ατόμων σε 2000 ελαιόδεντρα. Τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά.

Ενώ έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες έως σήμερα (ανασκόπηση από Daane and Johnson, 2010; Hoelmer et al., 2011), με διάφορα είδη παρασιτοειδών, ιδίως από την Αφρική, όπου ο βιολογικός έλεγχος του δάκου είναι αρκετά αποτελεσματικός, η εφαρμογή του βιολογικού ελέγχου ως βασικό μέσο για την καταπολέμηση του δάκου αντιμετωπίζει εμπόδια που χρειάζονται ακόμα αρκετή ερευνητική προσπάθεια ώστε να ξεπεραστούν. Τα εμπόδια αυτά αφορούν τη μαζική εκτροφή των παρασιτοειδών στο εργαστήριο, τη μόνιμη εγκατάσταση των πληθυσμών τους στις περιοχές που εισάγονται, το ρυθμό παρασιτισμού που παρουσιάζουν σε πραγματικές δοκιμές απελευθέρωσης, τον παρασιτισμό και άλλων ειδών που μπορεί να είναι ωφέλιμα κ.α..

Η **τεχνική του στείρου εντόμου** είναι μία μέθοδος που βασίζεται στην απελευθέρωση μεγάλων αριθμών, μαζικά εκτρεφόμενων και στειρωμένων ατόμων του προς καταπολέμηση εχθρού (Knippling, 1959, 1955). Όταν είναι εφικτό, προτιμάται μια καλά οριοθετημένη γεωγραφική περιοχή και αρσενικά άτομα για απελευθέρωση. Τα στειρωμένα αρσενικά έντομα απελευθερώνονται σε μεγάλους αριθμούς, ανταγωνίζονται τα αγρίου τύπου αρσενικά, γονιμοποιούν τα άγρια θηλυκά με σπέρμα που φέρει επικρατείς θνησιγόνες μεταλλαγές, οδηγώντας στην παραγωγή μη βιώσιμων ζυγωτών και την ωοαπόθεση στείρων ωών (Robinson, 2005).

Η τεχνική του στείρου εντόμου εφαρμόστηκε για πρώτη φορά με επιτυχία στη Βόρεια Αμερική για την καταπολέμηση της κοχλιόμυγας *Cochliomyia hominivorax*. Η μαζική εξαπόλυση των πρώτων στειρωμένων εντόμων ξεκίνησε τη δεκαετία το 1950 και συνεχίστηκε για πολλά χρόνια μέχρι να επιτευχθεί η εξάλειψη του εκτοπαρασίτου από την Κεντρική και Βόρεια Αμερική (ανασκόπηση από Mastrangelo and Welch, 2012). Η εφαρμογή αυτή αποδείχθηκε και οικονομικά αποδοτική δεδομένου ότι κόστιζε 13 εκατ. δολάρια/έτος, όταν το κόστος της ζημιάς από το εκτοπαρασίτο έφτανε το 1 δις δολάρια/έτος (Vargas-Terán et al., 2005).

Ο δάκος της ελιάς ήταν από τα πρώτα έντομα τα οποία εξετάστηκαν για την επέκταση της εφαρμογής της τεχνικής στείρου εντόμου, με στόχο την καταπολέμηση ή ακόμα και την εξάλειψή του. Η έρευνα για την βιολογία του δάκου με σκοπό την ανάπτυξη και την εφαρμογή της τεχνικής του στείρου εντόμου διήρκησε περίπου 20 χρόνια, όμως η προσπάθεια σχεδόν εγκαταλείφθηκε όταν θέματα που αφορούσαν τη μαζική εκτροφή, το υψηλό κόστος και τη χαμηλή ποιότητα των παραγόμενων εντόμων παρέμεναν άλυτα. Στην Ελλάδα έγιναν και κάποιες πιλοτικές προσπάθειες εφαρμογής σε ελαιώνες οι οποίες όμως δεν είχαν μεγάλη επιτυχία (ανασκόπηση από Nestel et al., 2016).

Παρ' όλα αυτά, τα τελευταία χρόνια, λόγω της έντονης γεωγραφικής εξάπλωσης του εντόμου και της έντονης ανάγκης για νέες μεθόδους καταπολέμησης, αναζωπυρώθηκε το επιστημονικό ενδιαφέρον για την ανάπτυξη και εφαρμογή της τεχνικής του στείρου εντόμου στο δάκο, αυτή τη φορά με χρήση της γενετικής μηχανικής για την εγκατάσταση νέων βελτιωμένων στελεχών του εντόμου (Ant et al., 2012). Παρά τα νέα ευρήματα όμως, η υλοποίηση της εφαρμογής της μεθόδου παραμένει δύσκολη, λόγω εμποδίων που παραμένουν σε σχέση με τη μαζική εκτροφή και την ποιότητα των παραγόμενων εντόμων.

Ακόμα, άλλες μέθοδοι που εφαρμόζονται, είναι η **χρήση φυσικών ή φυτικών ουσιών** όπως το φυσικό πύρεθρο και η ροτενόνη, η κάλυψη της ελιάς με χαλκό ή ορυκτά, όπως ο καολίνης (Εικόνα 1,4) και ο ζεόλιθος σε μορφή σκόνης, τα οποία δρουν σαν απωθητικά (Bueno and Jones, 2002; Caleca et al., 2010). Ο χαλκός θεωρείται επίσης ότι διαταράσσει τη σχέση συμβίωσης του δάκου με τα συμβιωτικά του βακτήρια (ανασκόπηση από Bigiotti et al., 2019). Τα συμβιωτικά βακτήρια και οι σχέσεις με τον ξενιστή τους, αποτελούν αντικείμενο μελέτης τα τελευταία χρόνια, στο πλαίσιο νέων προσεγγίσεων για την καταπολέμηση εντόμων-εχθρών γεωπονικού ενδιαφέροντος. Η σχέση συμβιώτη και ξενιστή πολλές φορές παίζει καθοριστικό ρόλο στη ζωτικότητα ή στην αρμοστικότητα του ξενιστή (Estes et al., 2014; Pavlidi et al., 2017), επομένως η στοχοποίηση της σχέσης αυτής, αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο για εύρεση νέων μεθόδων καταπολέμησης (Arora and Douglas, 2017; Bigiotti et al., 2019; Sinno et al., 2020).



Εικόνα 1.4: Παγίδες μαζικής παγίδευσης (επάνω) και επικάλυψη φύλλων και καρπών ελιάς με καολίνη (κάτω), για την καταπολέμηση του δάκου της ελιάς (*Bactrocera oleae*)., (Πηγή: <http://ceglenn.ucdavis.edu/> - τροποποιημένη εικόνα)

### 1.1.3.2 Χημική καταπολέμηση

Ιστορικά, οι εντατικές επεμβάσεις για την καταπολέμηση του δάκου ξεκίνησαν στο δεύτερο μισό του 20<sup>ου</sup> αιώνα, μετά το δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο. Οι επεμβάσεις πραγματοποιούνταν είτε με τη μορφή ψεκασμών κάλυψης, με στόχο όλα τα στάδια ανάπτυξης του εντόμου, είτε σαν δολωματικοί ψεκασμοί, με στόχο τα ενήλικα άτομα, με χρήση μελάσσας, υδρολυμένης πρωτεΐνης ή αμμωνίας ως δολώματα. Οι ψεκασμοί αρχικά εφαρμόζονταν από εδάφους με ατομικούς ψεκαστήρες, στη συνέχεια με τρακτέρ, και κατά τις δεκαετίες 1960 με 1970 εφαρμόστηκαν και ψεκασμοί από αέρος, με μικρά αεροπλάνα (ανασκόπηση από Nestel et al., 2016).

Τα συνθετικά οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, όπως και τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα εφαρμόστηκαν ευρέως κατά τη διάρκεια των δεκαετιών 1940 και 1950. Πιο συγκεκριμένα, τα DDT (dichlorodipehnyltrichloroethane), parathion και malathion

χρησιμοποιήθηκαν ευρέως σε ελαιώνες για την καταπολέμηση του δάκου για αρκετά χρόνια. Στη συνέχεια τα εντομοκτόνα αυτά αντικαταστάθηκαν από άλλα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα όπως το fenthion και το dimethoate, τα οποία εφαρμόστηκαν για περισσότερα από 40 χρόνια (ανασκόπηση από Nestel et al., 2016).

Από τη δεκαετία του 1990 και μετά, οι περιβαλλοντικές πολιτικές της Ευρωπαϊκής Ένωσης και οι ανησυχία για τη δημόσια υγεία λόγω της χρήσης των εντομοκτόνων οδήγησαν στην κατευθυνόμενη έρευνα για την εύρεση εναλλακτικών εντομοκτόνων ουσιών, με αποτέλεσμα, τα τελευταία 10-15 χρόνια έχουν επίσης εισαχθεί επίσης άλλες ομάδες εντομοκτόνων όπως τα πυρεθροειδή και οι σπινουσίνες.

Στην Ελλάδα, το εθνικό πρόγραμμα ψεκασμών ξεκίνησε το 1953 και συνεχίζεται έως σήμερα με κάποιες μικρές παραλλαγές. Το πρόγραμμα συντονίζεται από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων και περιλαμβάνει την πρόσληψη εποχιακού προσωπικού κάθε χρόνο και την παροχή των απαραίτητων αναλωσίμων (εντομοκτόνων, δολωμάτων, παγίδων κ.α.) για τους ψεκασμούς. Η υλοποίηση του προγράμματος οργανώνεται και εποπτεύεται από τις τοπικές Διευθύνσεις Αγροτική Οικονομίας και Κτηνιατρικής. Από την αρχή του προγράμματος η παρακολούθηση των πληθυσμών γίνεται με τοποθέτηση παγίδων McPhail και με συλλογή δειγμάτων ελαιόκαρπου, και σε συνδυασμό με τις κλιματικές συνθήκες προσδιορίζονται τα επίπεδα προσβολής. Η καταπολέμηση στο πλαίσιο του προγράμματος γίνονται μόνο με εφαρμογή δολωματικών ψεκασμών.

Οι δραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται τα τελευταία χρόνια για την καταπολέμηση του δάκου ανήκουν, με βάση τον τρόπο δράσης τους στα οργανοφωσφορικά, πυρεθροειδή, σπινουσίνες, και νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα (Πίνακας 1.1). Οι ενώσεις που ανήκουν στις ομάδες αυτές έχουν εξειδικευμένη δράση στις κυτταρικές και φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού του εντόμου. Στο πλαίσιο του εθνικού προγράμματος ψεκασμών τα τελευταία ~10-15 χρόνια, οι δραστικές που χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο, είναι το dimethoate, alpha-cypermethrin, lambda-cyhalothrin, deltamethrin spinosad και thiacloprid.

Πίνακας 1.1: Εγκεκριμένες χημικές ομάδες και δραστικές ουσίες που έχουν χρησιμοποιηθεί ή/και χρησιμοποιούνται τα τελευταία χρόνια στην Ελλάδα για την καταπολέμηση του δάκου της ελιάς (*B. oleae*), και οι τρόποι εφαρμογής τους (Πηγή:(ΥΠΑΑΤ, 2021)).

Χημική Ομάδα	Δραστική ουσία	Τρόπος εφαρμογής	
		Δολωματικός ψεκάσμος	Ψεκάσμος κάλυψης
Οργανοφωσφορικά	dimethoate	✓	✓
	phosmet	✓	✓
Πυρεθροειδή	alpha-cypermethrin	✓	
	lambda-cyhalothrin	✓	✓
	beta-cyfluthrin	✓	✓
	deltamethrin	✓	✓
	zeta-cypermethrin		✓
Σπινουσίνες	spinosad	✓	
Νεονικοτινοειδή	thiacloprid	✓	✓
	acetamiprid		✓

Πιο αναλυτικά, τα **οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα** είναι προϊόντα του φωσφορικού οξέος τα οποία προκύπτουν μετά από εστεροποίησή του με αλκοόλη. Τα εντομοκτόνα αυτά δρουν στις χολινεργικές συνάψεις του κεντρικού νευρικού συστήματος. Για την ακρίβεια, παρεμποδίζουν μόνιμα τη δράση του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (Acetylcholinesterase, AChE) μέσω της φωσφορυλίωσής του, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση της ακετυλοχολίνης στις συνάψεις. Η παρατεταμένη πρόσδεση της ακετυλοχολίνης στον μετασυναπτικό υποδοχέα προκαλεί εκτεταμένη νευρική διέγερση και τελικά υπερευαισθησία, σπασμούς και παράλυση (Yu, 2011). Στην ομάδα των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων για την καταπολέμηση του δάκου τα τελευταία χρόνια περιλαμβάνονται τα dimethoate και phosmet (ΥΠΑΑΤ, 2021).

Τα **πυρεθροειδή εντομοκτόνα** έχουν έντονη εντομοτοξική δράση, η οποία είναι ακαριαία (knockdown effect). Δρουν παρεμποδίζοντας τη μετάδοση των νευρικών σημάτων προσυναπτικά, στις διαύλους των ιόντων νατρίου. Η νευρική υπερδιέγερση οδηγεί τελικά σε ακαμψία και παράλυση (Yu, 2011). Στην ομάδα των πυρεθροειδών εντομοκτόνων για την καταπολέμηση του δάκου τα τελευταία χρόνια περιλαμβάνονται τα alpha-cypermethrin, beta-cyfluthrin, deltamethrin, lambda-cyhalothrin κ.α. (ΥΠΑΑΤ, 2021).

Οι **σπινουσίνες** είναι παράγωγα του ακτινομύκητα *Saccharopolyspora spinosa*. Οι σπινουσίνες αλληλεπιδρούν με τους νικοτινικούς υποδοχείς, με διαφορετικό τρόπο από τα νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα. Ο μοριακός στόχος τους είναι μία αλλοστερική θέση που σχετίζεται με την υπομονάδα α6 του νικοτινικού υποδοχέα (Geng et al., 2013; Watson et al., 2010). Προκαλούν υπερδιέγερση στο κεντρικό νευρικό σύστημα και



τελικά θάνατο (Scott 2008). Η δραστική ουσία spinosad είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη για τον έλεγχο εχθρών, συμπεριλαμβανομένου του δάκου, και αποτελεί μίγμα δύο μακροκυκλικών λακτονών, της σπινোসίνης A ως κύριο συστατικό και της σπινোসίνης D, ως δευτερεύον. Το κυριότερο πλεονέκτημα του spinosad είναι ότι σχετικά εκλεκτική δράση του σε έντομα στόχους, όπως τα Λεπιδόπτερα και τα Δίπτερα, παρουσιάζοντας γενικά μειωμένη δράση κατά των ωφέλιμων εντόμων και των εντόμων μη-στόχων (Kirst, 2010).

Τα **νεονικοτινοειδή** δρουν ως εκλεκτικοί ανταγωνιστές του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (nAChR), ο οποίος εδράζεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα των εντόμων (Bass et al., 2015). Το τελικό αποτέλεσμα της δράσης τους είναι η παράλυση και ο θάνατος. Στην ομάδα των νεονικοτινοειδών εντομοκτόνων για την καταπολέμηση του δάκου τα τελευταία χρόνια περιλαμβάνονται τα thiacloprid και acetamiprid (ΥΠΑΑΤ, 2021).

## 1.2 Κουνούπια-φορείς ασθενειών

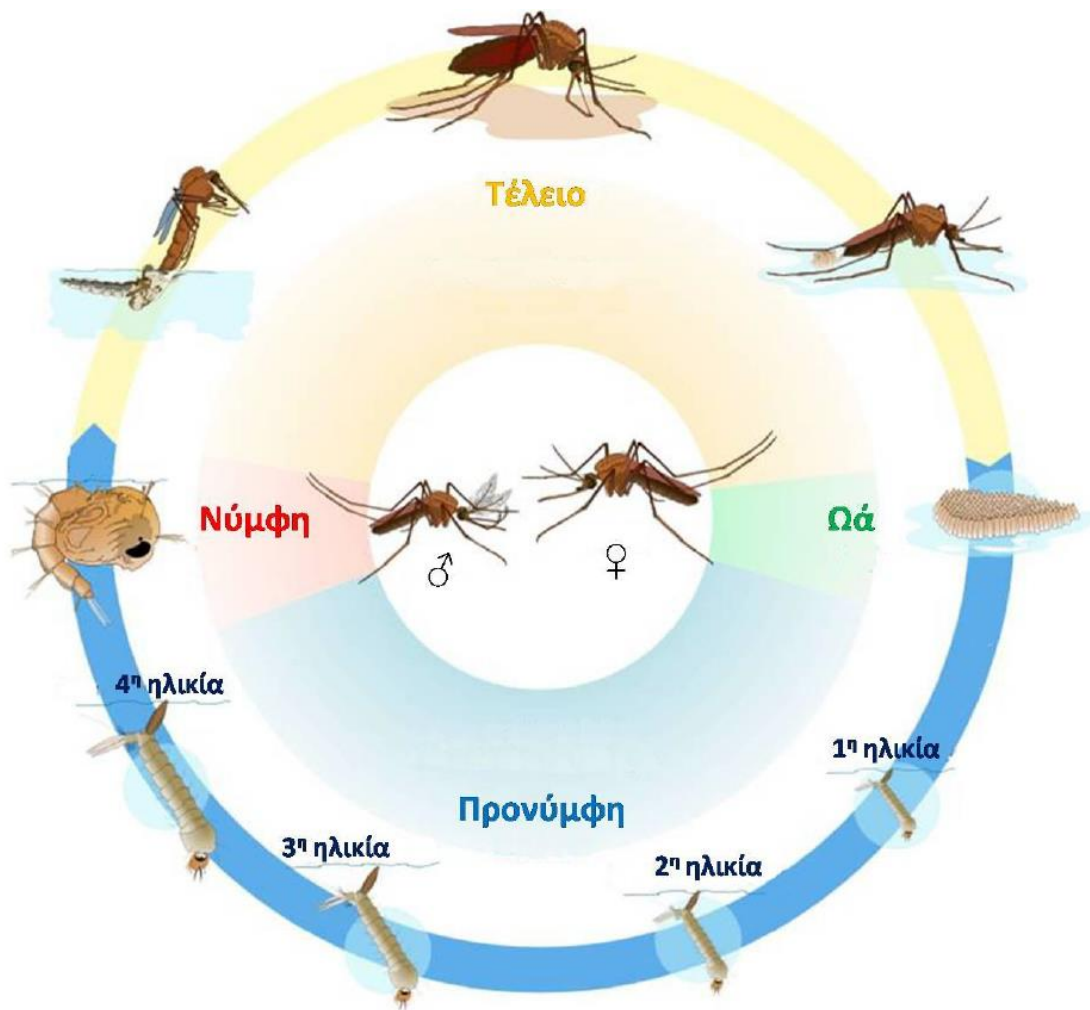
### 1.2.1 Περιγραφή

Τα κουνούπια απαρτίζουν μία οικογένεια εντόμων. η οποία παρουσιάζει τεράστιο ενδιαφέρον, δεδομένης της στενής σύνδεσής τους με τον άνθρωπο και τα ζώα, η οποία πηγάζει από την ανάγκη τους να τρέφονται με αίμα για την ολοκλήρωση του κύκλου ζωής τους. Είναι Δίπτερα έντομα που ανήκουν στην οικογένεια Culicidae, η οποία υποδιαιρείται στις υποοικογένειες Culicinae και Anophelinae. Σε αυτές εμπεριέχονται 44 γένη και πάνω από 3.500 είδη κουνουπιών (ανασκόπηση από Harbach 2007).

Τα κουνούπια είναι ολομετάβολα έντομα και ολοκληρώνουν το βιολογικό τους κύκλο σε τέσσερα διακριτά αναπτυξιακά στάδια, το ωό, την προνύμφη, τη νύμφη και το ενήλικο (τέλειο) (Εικόνα 1.5). Τα θηλυκό αναποθέτει τα ωά του, είτε σε συστάδες, είτε ένα-ένα (ανάλογα με το είδος), σε επιφάνεια νερού ή σε υγρά εδάφη που πρόκειται να πλημμυρίσουν. Η εμβρυϊκή ανάπτυξη ολοκληρώνεται και το ωό εκκολάπτεται συνήθως σε 2-7 ημέρες, ανάλογα με το είδος του κουνουπιού και τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Οι προνύμφη αναπτύσσεται εντός του υδάτινου περιβάλλοντος, και ολοκληρώνει 4 προνυμφικά στάδιά μέχρι την μεταμόρφωσή της σε νύμφη. Η

προνύμφη τρέφεται με μικροοργανισμούς, άλγη, πρωτόζωα, μικρά ασπόνδυλα και οργανικά υπολείμματα. Το στάδιο της προνύμφης μπορεί να διαρκέσει από λίγες ημέρες μέχρι και μερικές εβδομάδες ανάλογα τη θερμοκρασία, το είδος του κουνουπιού και τη διαθεσιμότητα τροφής. Η νύμφη είναι επίσης υδρόβια, κινείται μερικώς, αλλά δεν τρέφεται. Το στάδιο της νύμφης διαρκεί συνήθως 2 ημέρες, όμως ο χρόνος αυτός μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τη θερμοκρασία.

Το ενήλικο άτομο εμφανίζεται στην επιφάνεια του νερού και στη συνέχεια τρέφεται και προχωρά σε σύζευξη. Και τα δύο φύλα τρέφονται αρκετές φορές κατά τη διάρκεια της ζωής τους με σάκχαρα από νέκταρ φυτών και μελιτώματα, ενώ μόνο τα θηλυκά τρέφονται και με αίμα από σπονδυλωτά. Στα περισσότερα είδη κουνουπιών η λήψη αίματος είναι απαραίτητη για την ωρίμανση των ωών. Τα διαστήματα μεταξύ των γευμάτων αίματος παίζουν καθοριστικό ρόλο στη μετάδοση των ασθενειών μέσω των κουνουπιών. Η προτίμηση σε ξενιστή, ποικίλει σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των ειδών κουνουπιών και κατηγοριοποιούνται σε ορنيθοφιλικά, ζωοφιλικά, ανθρωποφιλικά ή να έχουν πιο ευκαιριακή συμπεριφορά. Η προσέλκυση από τον ξενιστή συνδέεται με οσφρητικά και οπτικά ερεθίσματα, όπως επίσης και με τη θερμότητα και υγρασία που περιβάλλουν το σώμα του ξενιστή (Foster and Walker, 2019).



**Εικόνα 1.5:** Απεικόνιση του βιολογικού κύκλου των κουνουπιών (Πηγή: Κιούλος 2014)

Τα ενήλικα κουνούπια έχουν στενόμακρο σώμα, δύο πτέρυγες, μακριά πόδια και επιμήκη φολιδωτή προβοσκίδα που προβάλλει προς τα εμπρός, μαζί με τις γναθικές προσακτρίδες (maxillary palps). Τα αρσενικά άτομα των περισσότερων ειδών κουνουπιών, διαφέρουν από τα θηλυκά στις κεραίες, φέροντας πολυάριθμες, πυκνές και μακριές τρίχες, και στις γναθικές προσακτρίδες, οι οποίες είναι μακριές και τριχωτές. Οι γναθικές προσακτρίδες είναι επίσης μακριές στα θηλυκά του γένους *Anopheles*, ενώ στα υπόλοιπα γένη είναι πιο μικρές. Το κεφάλι, ο θώρακας και η κοιλία τους είναι καλυμμένα με φολίδες (scales) και συστοιχίες από σμήριγγες (setae). Τα πόδια και οι πτέρυγές τους επίσης, συνήθως καλύπτονται από φολίδες. Το χρώμα των φολίδων στην κοιλία και το μέγεθος, το σχήμα και ο χρωματισμός των σμηρίγγων αποτελούν σημαντικούς μορφολογικούς χαρακτήρες για τη διάκριση των γενών και ειδών των κουνουπιών (Becker et al., 2010).

Όπως αναφέρθηκε, οι προνύμφες και οι νύμφες των κουνουπιών είναι υδρόβιες. Οι προνύμφες είναι άποδες και αποτελούνται από την κεφαλική κάψουλα, τον πεπλατυσμένο θώρακα και την κοιλία. Το σώμα των νυμφών αποτελείται από τον σφαιροειδή κεφαλοθώρακα και την στενότερη αρθρωτή κοιλία, η οποία βρίσκεται κάτω από τον κεφαλοθώρακα. Η αρθρωτή κοιλία επιτρέπει στη νύμφη την κίνησή της.

Η παρουσία των κουνουπιών αναφέρεται στα περισσότερα μέρη του πλανήτη, στην τροπική και στις εύκρατες ζώνες, ενώ η αφθονία των ειδών τους αυξάνεται στις περιοχές που βρίσκονται πιο κοντά στον Ισημερινό (Εικόνα 1.6) (Foley et al., 2007).



**Εικόνα 1.6: Παγκόσμιος χάρτης του συνολικού αριθμού των ειδών κουνουπιών ανά χώρα.** Τα δεδομένα προέρχονται από τον Συστηματικό Κατάλογο των Culicidae (<http://www.mosquitocatalog.org>) (Πηγή: Foley et al. 2007)

Τα σημαντικότερα είδη, βάσει της δυναμικής τους να μεταφέρουν ασθένειες ανήκουν κυρίως στα γένη *Culex*, *Aedes* και *Anopheles*.

## 1.2.2 Υγειονομική σημασία των κουνουπιών και όχληση

Ιστορικά, τα κουνούπια, περισσότερο ίσως από κάθε άλλη ομάδα αρθροπόδων, επηρεάζει τις ανθρώπινες δραστηριότητες, μέσω της μετάδοσης ασθενειών και μέσω της όχλησης που προκαλούν.

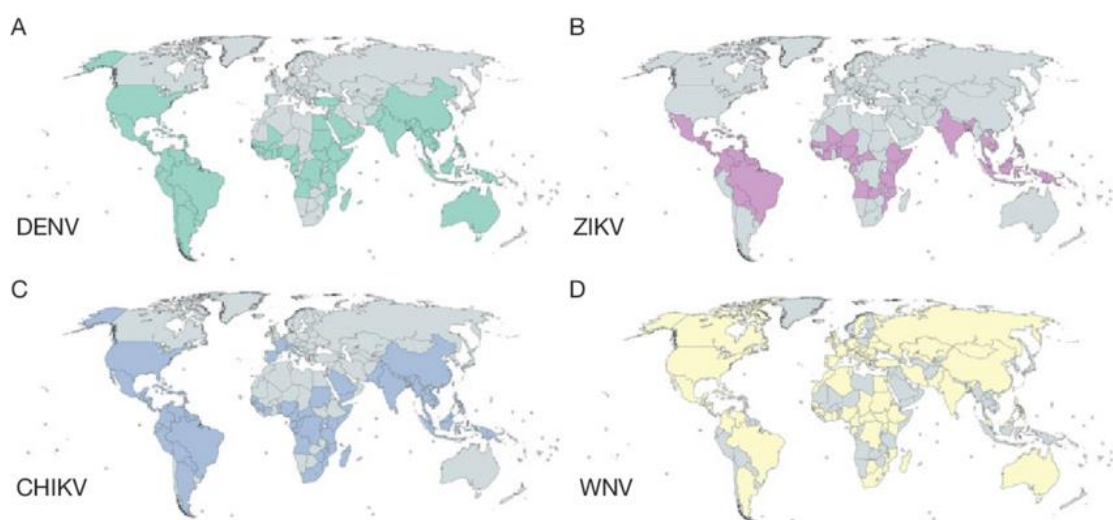
## Παρασιτικές ασθένειες και η επανεμφάνισή τους

Ασθένειες όπως η ελονοσία, η φιλαρίαση και ιώσεις που προκαλούν το δάγκειο πυρετό, τον κίτρινο πυρετό, τον πυρετό του Δυτικού Νείλου και τον Chikungunya οφείλονται σε πρωτόζωα, νηματώδεις και ιούς αντίστοιχα. Χάρη στη συμπεριφορά τους να ρουφούν αίμα, τα κουνούπια αποκτούν τέτοια παθογόνα ή παράσιτα από ένα μολυσμένο (σπονδυλωτό) ξενιστή και τα μεταφέρουν σε κάποιο άλλο, εάν η οικολογία και η φυσιολογία του κουνουπιού είναι κατάλληλη για μετάδοση. Οι πιο επικίνδυνοι φορείς, αναφορικά με την ικανότητα μετάδοσης παθογόνων, πρέπει να σχετίζονται στενά με τους ξενιστές τους και η μακροβιότητά τους πρέπει να είναι επαρκής για να επιτευχθεί ο πολλαπλασιασμός και η ανάπτυξη των παθογόνων/παρασίτων ως το μολυσματικό στάδιο (Cohuet et al., 2010; Lim et al., 2018). Οι πιο σημαντικοί φορείς ασθενειών ανήκουν στα γένη *Anopheles*, *Culex* και *Aedes* (WHO, 2020a)

Η ελονοσία είναι από τις σημαντικότερες ασθένειες που μεταδίδονται από τα κουνούπια, και η παρουσία της από την αρχαιότητα ακόμα, έχει έναν τεράστιο υγειονομικό και κοινωνικο-οικονομικό αντίκτυπο. Προκαλείται από πρωτόζωα του γένους *Plasmodium*, εκ των οποίων πέντε είδη προσβάλλουν τον άνθρωπο (*P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax*, *P. ovale* και *P. knowlesi*), ενώ υπάρχουν επίσης αρκετά είδη που προσβάλλουν άλλα θηλαστικά, πτηνά και ερπετά. Οι φορείς της ελονοσίας ανήκουν αποκλειστικά στο γένος *Anopheles*, με κυριότερο φορέα στην Αφρική, το είδος *Anopheles gambiae*. Η ελονοσία απειλεί σχεδόν τον μισό πληθυσμό στον πλανήτη (WHO, 2021a). Το 2019, παρουσιάστηκαν περίπου 229 εκατ. περιστατικά ελονοσίας παγκοσμίως και 409.000 θάνατοι, με το 67% να είναι σε παιδιά κάτω των 5 ετών (WHO, 2020b). Το 95% περίπου των παραπάνω περιστατικών αφορούν χώρες της Αφρικής (WHO, 2021a), όμως παρ' όλα αυτά, η ελονοσία αποτελεί πρόβλημα μείζονος υγειονομικής σημασίας και στις υπόλοιπες ηπείρους.

Στην Ευρώπη, η ελονοσία ήταν ενδημική ασθένεια έως τη δεκαετία του 1970, όταν διάφοροι παράγοντες συντέλεσαν στην εξάλειψή της. Παρ' όλα αυτά τα τελευταία χρόνια, έχουν υπάρξει κάποια αυτόχθονα και εισαγόμενα περιστατικά της ασθένειας. Από το 2015 έως το 2019 καταγράφηκαν πάνω από 8000 περιστατικά ετησίως (ECDC, 2021). Στην Ελλάδα, το 2011 τα αυτόχθονα περιστατικά έφτασαν τα 42, ενώ το 2016 τα εισαγόμενα περιστατικά ήταν 111 (NPHO, 2019). Παρά το γεγονός ότι η διασπορά της ασθένειας είναι σχετικά περιορισμένη στην Ευρώπη, και κατ' επέκταση στην Ελλάδα, οι ευνοϊκές κλιματολογικές συνθήκες για τη μετάδοση της ασθένειας καθώς και η παρουσία φορέων του γένους *Anopheles*, δημιουργούν ανησυχία για την επανεμφάνιση και εξάπλωσή της.

Οι αρμποϊοί (Arbovirus: Arthropod-borne-virus) είναι ιοί που αναπαράγονται στα αρθρόποδα και μεταδίδονται μέσω αυτών στα σπονδυλωτά. Τα αρθρόποδα μολύνονται από τον ιό όταν λαμβάνουν αίμα από κάποιο προσβεβλημένο σπονδυλωτό και μετά από ένα κύκλο ταχείας αναπαραγωγής στο φορέα, ο ιός μπορεί να μεταδοθεί σε κάποιο άλλο σπονδυλωτό-ξενιστή. Είναι επίσης πιθανό, οι αρμποϊοί να περάσουν στα αρθρόποδα από τη μία γενιά στην επόμενη, μέσω της κάθετης μετάδοσης. Στους πιο σημαντικούς παγκοσμίως αρμποϊούς ανήκουν ο ιός Τσικουνγκούνια (Chikungunya virus), ο ιός του Κίτρινου πυρετού (Yellow fever virus), ο ιός του Δάγκειου πυρετού (Dengue fever virus), ο ιός του Δυτικού Νείλου (West Nile virus), και ο ιός Ζίκα (Zika virus). Τα τελευταία 50 χρόνια, οι ασθένειες αυτές έχουν εμφανιστεί ή ξαναεμφανιστεί παγκοσμίως (Εικόνα 1.7).

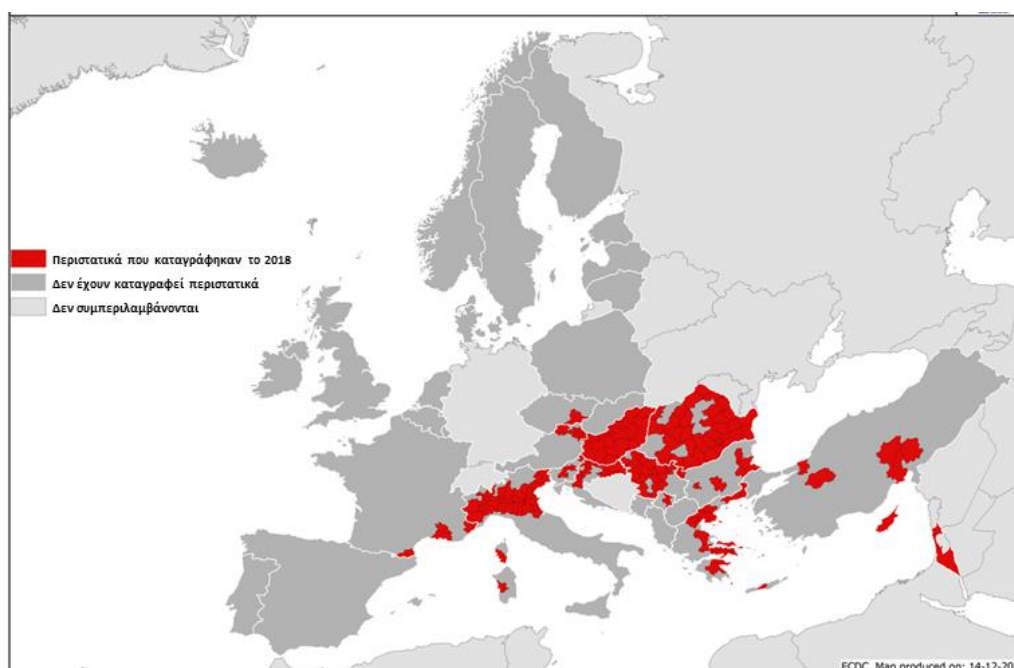


**Εικόνα 1.7 Παγκόσμια εξάπλωση των αρμποϊών.** Ο χάρτης δείχνει τις περιοχές στις οποίες υπήρξε ή υπάρχει μετάδοση του ιού του Δάγκειου πυρετού (A), του ιού Ζίκα (B), του ιού Τσικουνγκούνια (C) και του ιού του Δυτικού Νείλου (D) (Πηγή: Wu et al. 2019)

Ο ιός του Δάγκειου πυρετού προκαλεί περίπου 390 εκατ. περιστατικά κάθε χρόνο (ανασκόπηση από [Roiz et al., 2018](#)), και το 2019 δηλώθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) ως μία από τις 10 απειλητικές ασθένειες για την παγκόσμια δημόσια υγεία (WHO, 2021b). Ο ιός Τσικουνγκούνια έχει εξαπλωθεί παγκοσμίως από το 2000 και ο Ζίκα τα τελευταία 5-6 χρόνια, ενώ ο ιός του Κίτρινου πυρετού έχει αναζωπυρωθεί στην Αφρική και στην Αμερική (ανασκόπηση από [Roiz et al. 2018](#)). Όλοι αυτοί οι ιοί μεταδίδονται από φορείς που ανήκουν στο γένος *Aedes* με κυριότερους φορείς, το *Aedes aegypti* και το *Aedes albopictus*, με το δεύτερο να

αποτελεί ένα από τα πιο χωροκατακτητικά είδη παγκοσμίως (ανασκόπηση από Pereira-Dos-Santos et al. 2020).

Ο ιός του Δυτικού Νείλου, είναι παγκοσμίως από τις πιο εξαπλωμένες νόσους που μεταδίδονται από αρθρόποδα (Εικόνα 1.8). Τα τελευταία 20 χρόνια συναντάται σε όλες τις ηπείρους εκτός από την Ανταρκτική, με αρκετές εξάρσεις σε ανθρώπους, πτηνά και άλογα. Οι μεγαλύτερες εξάρσεις των τελευταίων ετών έχουν εκδηλωθεί στην Αμερική και στην Ευρώπη (ανασκόπηση από Petersen et al. 2013, Camp and Nowotny 2020). Το 2018, εκδηλώθηκε στη νότια Ευρώπη, και στην Ελλάδα, η μεγαλύτερη έξαρση περιστατικών που καταγράφηκε (ECDC, 2018). Ο ιός του Δυτικού Νείλου μεταδίδεται κυρίως από κουνούπια του είδους *Culex ripiens*. Ο φορέας *Aedes albopictus*, μπορεί επίσης να μεταδώσει τον ιό αλλά θεωρείται δευτερεύουσας σημασίας (Fortuna et al., 2015).



**Εικόνα 1.8: Εξάπλωση των περιστατικών του ιού του Δυτικού Νείλου στις προσβεβλημένες χώρες της Ευρώπης και των γειτονικών περιοχών. (Πηγή: (ECDC 2018 - τροποποιημένη εικόνα)**

Ο ρόλος των φορέων και των διατροφικών τους προτιμήσεων (ανθρωποφιλικό ή/και ζωοφιλικό/ορνιθοφιλικό) είναι υψίστης σημασίας για τη γεωγραφική εξάπλωση των ασθενειών αυτών. Για παράδειγμα, το 1999 ο ιός του Δυτικού Νείλου εμφανίστηκε στην Αμερική, στην περιοχή της Νέας Υόρκης και σε διάστημα 5 ετών έγινε ενδημικός

στο μεγαλύτερο μέρος της ηπείρου, γεγονός που έχει αποδοθεί στην παρουσία των φορέων του ιού και των αποδημητικών πτηνών, παρ' όλο που η εισαγωγή του ιού ήταν ανθρωπογενής (ανασκόπηση από Campbell et al. 2002). Το είδος *Cx. pipiens*, συναντάται σε τρεις διαφορετικούς βιότοπους, τον *Cx pipiens pipiens*, τον *Cx. pipiens molestus* και τον υβριδικό *Cx. pipiens pipiens/molestus*. Ο τελευταίος θεωρείται πολύ ανταγωνιστικός φορέας λόγω της ευκαιριακής διατροφικής συμπεριφοράς του, με αποτέλεσμα να συμβάλλει καθοριστικά στη διατήρηση του ιού στα πτηνά και κατ' επέκταση να ευνοεί τη μετάδοση της ασθένειας και στον άνθρωπο (Fonseca et al., 2004).

Η λυμφατική φιλαρίαση ενδημεί σε τουλάχιστον 80 τροπικές και υποτροπικές χώρες και προσβάλλει περισσότερους από 120 εκατ. ανθρώπους ετησίως. Από τις προσβολές αυτές, το 90% οφείλονται στο νηματώδη *Wuchereria bancrofti*, οι υπόλοιπες οφείλονται κυρίως στο νηματώδη *Brugia malayi* και δευτερευόντως στον *Brugia timori*. Οι κύριοι φορείς του *Wuchereria bancrofti* στις αστικές και ημιαστικές περιοχές είναι είδη του γένους *Culex*, στις αγροτικές περιοχές είδη του γένους *Anopheles* και στα νησιά του ειρηνικού, είδη του γένους *Aedes*. Τα παράσιτα του γένους *Brugia* μεταφέρονται κυρίως μέσω ειδών του γένους *Mansonia* (Ottesen, 2006).

Οι ασθένειες αυτές ήταν υπό έλεγχο για κάποιες δεκαετίες κυρίως με καταπολέμηση των κουνουπιών φορέων, όμως, όπως αναφέρθηκε, κατά τα τελευταία 50 χρόνια ξαναεμφανίζονται, ενώ παράλληλα εξαπλώνονται νέες ασθένειες. Η ελονοσία και ο δάγκειος πυρετός επανεμφανίστηκαν στην Ασία και στην Αμερική, ο ιός του Δυτικού Νείλου έχει διαδοθεί ραγδαία στις Η.Π.Α. και την Ευρώπη, και η ασθένεια Chikungunya έχει αναγεννηθεί στην Ασία και την Αφρική, ενώ παράλληλα έχει εμφανιστεί και στην Ευρώπη (Gubler, 2007, 1998; Roos, 2007; Yergolkar et al., 2006).

## Όχληση

Εκτός από τη μετάδοση ασθενειών, άξια αναφοράς είναι και η όχληση που προκαλείται από τα κουνούπια. Το τσίμπημα του κουνουπιού συνήθως προκαλεί αλλεργική αντίδραση η οποία επιφέρει κνησμό και οίδημα. Η όχληση που προκαλείται από τα κουνούπια μπορεί να επιδράσει στην αγροτική και τουριστική ανάπτυξη μίας περιοχής, ανάλογα με τη πυκνότητα του πληθυσμού τους. Ιδιαίτερα κατά τους θερμούς μήνες οι αποδόσεις των ατόμων και η παραγωγικότητα των οικόσιτων ζώων μπορεί να μειωθούν. Η ύπαρξη μεγάλης πυκνότητας κουνουπιών σε μία περιοχή μπορεί να είναι παράγοντας μείωσης της οικοτουριστικής της ανάπτυξης λόγω της ενόχλησης που προκαλούν στους ανθρώπους (ΕΟΔΥ, 2018). Το πρόβλημα της όχλησης από τα



κουνούπια είναι πιο έντονο στις χώρες της βόρειας εύκρατης ζώνης, ιδιαίτερα στις αγροτικές περιοχές τους. Στην Ελλάδα, το πρόβλημα εντοπίζεται περισσότερο στη Β. Ελλάδα λόγω της ύπαρξης μεγάλου αριθμού ορυζώνων και σε περιοχές με μεγάλες εκτάσεις φυσικών και τεχνητών υγροτόπων (Εικόνα 1.9).



**Εικόνα 1.9:** Πληθυσμός κουνουπιών στο στάδιο της νύμφης στις παρυφές φυσικού υγροτόπου στη λιμνοθάλασσα Αιτωλικού (Φωτογραφία: Μηλιώτης Α.)

### **1.2.3 Καταπολέμηση των κουνουπιών**

Ο έλεγχος του φορέα είναι το σημαντικότερο κομμάτι της καταπολέμησης των ασθενειών που μεταδίδονται με φορείς. Παρά την ύπαρξη κάποιων εμβολίων για κάποιους αρμψοϊούς π.χ. για το Δάγκειο πυρετό, δεν έχουν φτάσει ακόμα σε ασφαλές επίπεδο αποτελεσματικότητας. Χημειοπροστατευτικές και θεραπευτικές ουσίες υπάρχουν για την ελονοσία και τη φιλαρίαση, χωρίς όμως να έχουν πάντα τα επιθυμητά αποτελέσματα (WHO, 2021b, 2021a, 2018a) Συνεπώς, ο έλεγχος των πληθυσμών του φορέα προς αποφυγή της μετάδοσης της ασθένειας στους ξενιστές παραμένει το κυριότερο όπλο υπέρ της μείωσης του αριθμού των νοσούντων

περιστατικών. Επίσης, σε κάθε περίπτωση, ο έλεγχος του φορέα σε ένα μεγάλο βαθμό, αποτελεί προϋπόθεση για να υπάρξει ένα ικανοποιητικό επίπεδο αποτελεσματικότητας στα εμβόλια ή θεραπείες των εν λόγω ασθενειών.

Η εξάλειψη των φορέων ή των νόσων, είναι ένας πολύ δύσκολος στόχος, ο οποίος βάσει των κοινωνικο-οικονομικών συνθηκών, πιθανότατα δεν είναι εφικτός, εκτός ίσως από περιπτώσεις, μικρών, απομονωμένων περιοχών. Ο πιο ρεαλιστικός στόχος των προγραμμάτων ελέγχου των κουνουπιών είναι η ολοκληρωμένη διαχείριση του φορέα (Integrated Vector Management, IVM) η οποία δύναται να οδηγήσει σε μείωση των πληθυσμών των κουνουπιών και κατ' επέκταση των σχετικών ασθενειών, με την εφαρμογή συνδυασμού μεθόδων καταπολέμησης. Ανάλογα με τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση των πληθυσμών του φορέα, ο έλεγχος διακρίνεται σε: βιολογικό, χημικό, γενετικό, φυσικό και περιβαλλοντική διαχείριση των φορέων.

### 1.2.3.1 Μη-χημική καταπολέμηση

Ο **βιολογικός έλεγχος** στα κουνούπια, βασίζεται κυρίως στη χρήση φυσικών εχθρών (ψάρια, κωπήποδα, αμφίβια, προνύμφες άλλων ειδών κουνουπιών κ.α.), μικροοργανισμών (βακτήρια και εντομοπαθογόνοι μύκητες) και ουσιών φυτικής προέλευσης. Από τους θηρευτές, τα ψάρια που καταναλώνουν προνύμφες, με πιο μελετημένο το είδος *Gambusia affinis* (γνωστό και ως ψάρι κουνουπιών), έχουν βρεθεί να είναι αρκετά αποτελεσματικά (Chandra et al., 2008; Kumar and Hwang, 2006; Van Dam and Walton, 2007), καθώς και κάποια είδη κωπηπόδων, τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί και σε προγράμματα καταπολέμησης (Vu et al., 2005). Παρ' όλα αυτά η εισαγωγή (ξενικών) ειδών ψαριών που καταναλώνουν προνύμφες, μπορεί συχνά να απειλήσει την ενδημική υδρόβια πανίδα, και επιπλέον, τα κωπήποδα, περιορίζονται αρκετά ως προς την εφαρμογή τους στα είδη του γένους *Aedes*. Από τους μικροοργανισμούς, το βακτήριο *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (Bti), είναι το πιο κοινό που χρησιμοποιείται και έχει εκλεκτική δράση στα προνυμφικά στάδια των εντόμων. Παρ' όλα αυτά, η χρήση του είναι αρκετά δαπανηρή καθώς επίσης, τα έντομα μπορούν να αναπτύξουν ανθεκτικότητα στις τοξίνες του βακτηρίου (ανασκόπηση από Melo et al., 2016). Οι ουσίες φυτικής προέλευσης, όπως τα αιθέρια έλαια, μπορεί να έχουν απωθητική, ωοκτόνο, προνυμφοκτόνο, νυμφοκτόνο ή ακμαιοκτόνο δράση (ανασκόπηση από Benelli, 2015).

Ο **γενετικός έλεγχος** του φορέα στοχεύει στη εξάλειψη του πληθυσμού του. Περιλαμβάνει την τεχνική του στείρου εντόμου, την απελευθέρωση εντόμων με

κυρίαρχα θνησιγόνα γονίδια, τη χρήση του βακτηρίου *Wolbachia* και τη γενετική παρέμβαση με το σύστημα CRISPR-Cas9 (ανασκόπηση από Achee et al. 2019). Έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχημένα στο παρελθόν για την καταπολέμηση πληθυσμών εντόμων γεωργικής σημασίας ή ακόμα και φορέων ασθενειών και σε πολύ λίγες περιπτώσεις κουνουπιών. Ένα παράδειγμα αποτελεί η προσπάθεια ελέγχου των πληθυσμών του *Ae. aegypti* (κυριότεροι φορείς του δάγκειου πυρετού) σε μία περιοχή του Grand Cayman των νήσων Cayman η οποία απέδωσε ελπιδοφόρα αποτελέσματα για τη αντιμετώπιση του δάγκειου πυρετού (Harris et al., 2011).

**Φυσικός έλεγχος** θεωρείται η καταπολέμηση των εντόμων με φυσικά ή μηχανικά μέσα. Τα φυσικά μέτρα στοχεύουν και τις προνύμφες και τα ενήλικα έντομα. Για τον έλεγχο των προνυμφών και νυμφών χρησιμοποιούνται φυσικά μέσα τα οποία μπορεί να αποτρέπουν την εναπόθεση ωών στην επιφάνεια του νερού, να είναι τοξικά, να προκαλούν πνιγμό ή ασφυξία (Beehler and Mulla, 1996), να αλλάζουν φυσικοχημικά την αλληλεπίδραση νερού-αέρα οδηγώντας σε ανοξία (Garrett and White, 1977) κ.α. Για τον έλεγχο των ενήλικων κουνουπιών από τα πιο συνήθη μέσα είναι οι μαζικές παγίδες οι οποίες είναι συσκευές που βασίζονται στη χρήση ποικίλων συνδυασμών φωτός, διοξειδίου του άνθρακα, υδρατμών, θερμότητας κ.α. ώστε να προσελκύσουν τα κουνούπια. Τα κουνούπια πεθαίνουν είτε από την ξήρανση μέσα στη συσκευή, ή από ηλεκτρόδια υψηλής τάσης (Kline, 2007).

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, η **περιβαλλοντική διαχείριση** στοχεύει στην παρεμπόδιση ή την ελαχιστοποίηση της αναπαραγωγής και διασποράς του φορέα και τη μείωση της επαφής ανθρώπου-φορέα-παθογόνου. Αυτό μπορεί να συνεπάγεται δύο επιλογές ή το συνδυασμό τους: (α) την περιβαλλοντική τροποποίηση (μόνιμες φυσικές αλλαγές στις θέσεις αναπαραγωγής του φορέα), όπως η αποξήρανση των θέσεων αναπαραγωγής κ.α., και (β) τον περιβαλλοντικό χειρισμό (προσωρινές αλλαγές στο ενδιαίτημα του φορέα ώστε να δημιουργηθούν δυσμενείς συνθήκες για την αναπαραγωγή του) όπως η διακοπτόμενη άρδευση των ορυζώνων, προσωρινό πλημμύρισμα ή αφυδάτωση φυσικών ή τεχνητών υγροτόπων, απομάκρυνση της βλάστησης κ.α. (WHO, 1982). Ο περιβαλλοντικός έλεγχος έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε περιπτώσεις καταπολέμησης της ελονοσίας στην Ινδονησία και στη Ζάμπια (Baer et al., 1999; Takken et al., 1990), όμως απαιτεί πολύ καλό και στοχευμένο σχεδιασμό.

### 1.2.3.2 Χημική καταπολέμηση

Ο χημικός έλεγχος ξεκίνησε να χρησιμοποιείται εκτεταμένα στην καταπολέμηση των ενηλίκων και των προνυμφών από τα τέλη του 19ου αιώνα με την ανακάλυψη αποτελεσματικών συνθετικών εντομοκτόνων (Bremner, 2001). Το DDT ήταν το πρώτο συνθετικό εντομοκτόνο που χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία σε ευρεία κλίμακα. Τα βασικά προβλήματα που παρουσίασε η χρήση των συνθετικών εντομοκτόνων ήταν οι επιδράσεις τους στο περιβάλλον και η ανάπτυξη ανθεκτικότητας των εντόμων σε αυτά (Forgash, 1984). Παρ' όλα αυτά ο χημικός έλεγχος εξακολουθεί να είναι ο κύριος τρόπος καταπολέμησης.

#### 1.2.4.1 Τρόποι εφαρμογής χημικής καταπολέμησης

Η χημική καταπολέμηση εφαρμόζεται με διάφορους τρόπους, οι οποίοι περιγράφονται συνοπτικά παρακάτω.

Οι **υπολειμματικοί ψεκασμοί εσωτερικών επιφανειών (Indoor residual spray, IRS)** περιλαμβάνει την εφαρμογή εντομοκτόνων σε επιφάνειες των κτισμάτων, όπως τοίχους, οροφές, σκέπαστρα ζώων κ.α., με τις οποίες έρχονται σε επαφή τα κουνούπια. Η επιλογή των κατάλληλων εντομοκτόνων εξαρτάται από τη συμπεριφορά του κουνουπιού-φορέα-στόχου και την ευαισθησία που εμφανίζει στα διάφορα εντομοκτόνα, την ασφάλεια για τους ανθρώπους και το περιβάλλον και την οικονομική αποδοτικότητα (WHO, 2006).

Οι **ψεκασμοί/καπνισμοί χώρων (Space spray/fogging)** μπορούν να εφαρμοστούν ως θερμική ομίχλη (thermal fog) ή ως ψεκασμός υπέρμικρου όγκου (Ultra-Low Volume fog/spray) (WHO, 1990). Και με τους δύο τρόπους ελευθερώνονται πολύ μικρά σταγονίδια εντομοκτόνου που αιωρούνται στον αέρα με τα οποία έρχονται σε επαφή τα κουνούπια. Ο θάνατος των κουνουπιών είναι πολύ γρήγορος αλλά απαιτούνται αρκετές επαναλήψεις της εφαρμογής διότι οι ψεκασμοί αυτοί δεν έχουν υπολειμματική διάρκεια. Οι ψεκασμοί πρέπει να συμπίπτουν χρονικά με τη μέγιστη δραστηριότητα των κουνουπιών.

Οι **εμβαπτισμένες σε εντομοκτόνο κουνουπιέρες (Insecticide-treated nets, ITNs)** είναι προστατευτικά υλικά σε μορφή διχτυού, όπως σήτες ή κουνουπιέρες, τα οποία είναι εμποτισμένα με εντομοκτόνες ουσίες. Τα ITNs λειτουργούν με δύο τρόπους: πρώτον, προστατεύουν τα άτομα από το τσίμπημα του κουνουπιού, και δεύτερον, σκοτώνουν τα κουνούπια που προσπαθούν να τσιμπήσουν, με αποτέλεσμα να μειώνονται συνολικά οι πληθυσμοί των κουνουπιών της κοινότητας (Hawley et al.,

2003). Τα ITNs απαιτούν σχετικά συχνό επανεμποτισμό με εντομοκτόνο. Μία παραλλαγή των ITNs αποτελούν τα LLINs (Long-Lasting Insecticidal Nets) των οποίων η βιολογική δράση διαρκεί για όσο καιρό διαρκεί περίπου και το δίχτυ (3-5 χρόνια) (WHO, 2005). Χρησιμοποιούνται εντομοκτόνα χαμηλής τοξικότητας στα θηλαστικά και ταχείας δράσης.



**Εικόνα 1.10: Παραδείγματα εφαρμογής χημικής καταπολέμησης.** (Α) Εφαρμογή εντομοκτόνου σε επιφάνεια τοίχου (IRS) σε σπίτι στη Μοζαμβίκη. (Β) Μία οικογένεια που κοιμάται μέσα σε κουνουπιέρα εμποτισμένη με εντομοκτόνο (ITN) για να προστατευτεί από κουνούπια που μεταφέρουν ελονοσία. (Πηγή: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov))

Η **χημική προνυμφοκτονία** στοχεύει στην καταπολέμηση των φορέων με τον έλεγχο των προνυμφών στις θέσεις αναπαραγωγής (υδάτινους όγκους), με χημικές ουσίες.

Η **προσωπική/ατομική προστασία** περιλαμβάνει την εφαρμογή προϊόντων για προστασία από τα τσιμπήματα των κουνουπιών, όπως απωθητικά έλαια και κρέμες, καπνογόνες σπείρες (εντομοαπωθητικά χώρου) κ.α. Η αποτελεσματικότητά τους διαρκεί για λίγες ώρες παρέχοντας 60-80% προστασία (Curtis et al., 1987).

#### **1.2.4.2 Εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται**

Τα εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται στη καταπολέμηση των κουνουπιών στοχεύουν είτε τις προνύμφες και νύμφες τους, είτε τα ενήλικα άτομα (Πίνακας 1.2), και ανήκουν σε πέντε χημικές ομάδες συνθετικών οργανικών εντομοκτόνων. Τα οργανοχλωριωμένα, τα οργανοφωσφορικά, τα καρβαμιδικά, τα πυρεθροειδή, οι

σπινουσίνες και οι ρυθμιστές ανάπτυξης. Οι ενώσεις αυτές έχουν εξειδικευμένη δράση στις κυτταρικές και φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού του εντόμου. Παρακάτω περιγράφονται οι ομάδες αυτές και ο μηχανισμός δράσης τους.

**Πίνακας 1.2: Χημικές ομάδες εντομοκτόνων, δραστικές ουσίες και αναπτυξιακό στάδιο εφαρμογής, που συστήνονται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας στην καταπολέμηση των κουνουπιών (WHO, 2018b, 2013).**

Χημική ομάδα	Δραστικές ουσίες	Αναπτυξιακό στάδιο εφαρμογής	
		Ενήλικα	Προνύμφες/Νύμφες
<b>Οργανοχλωριωμένα</b>	DDT	✓	
<b>Οργανοφωσφορικά</b>	temephos, chlorpyrifos, fenthion		✓
	malathion, fenitrothion	✓	
	pirimiphos-methyl	✓	✓
<b>Καρβαμιδικά</b>	bendiocard, propoxur	✓	
<b>Πυρεθροειδή</b>	alpha-cypermethrin, lambda-cyhalothrin, cyfluthrin, bifethrin, deltamethrin, etofenprox	✓	
<b>Σπινουσίνες</b>	spinosad		✓
<b>Ρυθμιστές ανάπτυξης</b>	diflubenzuron, novaluron, pyriproxyfen, methoprene		✓
<b>Νεονικοτινοειδή</b>	clothianidin	✓	

Τα **οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα** είναι παράγωγα οργανοχλωριωμένων υδρογονανθράκων. Παρεμποδίζουν την αξονική μετάδοση των νευρικών σημάτων, προκαλώντας πολλαπλές εκφορτίσεις, μεγάλη νευρική διέγερση, σπασμούς και τελικά θάνατο. Τα κυκλοδιένια δρουν στον υποδοχέα του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (Gamma-Aminobutyric Acid, GABA receptor), ενώ τα υπόλοιπα οργανοχλωριωμένα δρουν στις διαύλους των ιόντων νατρίου (ανασκόπηση από Jayaraj et al. 2016). Τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα εφαρμόζονται σε ενήλικα κουνούπια. Το DDT περιλαμβάνεται σε αυτήν την ομάδα εντομοκτόνων, όπως και το dieldrin (κυκλοδιένιο). Η χρήση των οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων έχει απαγορευτεί στην Ευρώπη εδώ και πολλά χρόνια, όπως και στις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες.

Τα **οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα**, όπως αναφέρονται στο Κεφ. 1.1.4, χρησιμοποιούνται τόσο για τον έλεγχο των προνυμφών, όπως οι δραστικές temephos,

chlorpyrifos, pirimiphos-methyl κ.α., όσο και για τον έλεγχο των ενηλικών όπως οι δραστικές malathion, fenitrothion και pirimiphos-methyl. Η χρήση τους έχει σταματήσει τα τελευταία χρόνια στην Ευρώπη, λόγω του σχετικού ευρωπαϊκού κανονισμού, όμως αποτελούν εφεδρικά εργαλεία σε περιπτώσεις έκτακτης ανάγκης.

Τα **καρβαμιδικά εντομοκτόνα** είναι παράγωγα του καρβαμιδικού οξέος. Παρουσιάζουν άμεση δράση στο νευρικό σύστημα και προκαλούν ταχεία κατάρριψη των εντόμων (knockdown effect). Χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση των ενηλικών κουνουπιών. Όπως τα οργανοφωσφορικά, παρεμποδίζουν τη δράση του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση. Όμως, η παρεμπόδιση της ακετυλοχολινεστεράσης σε αυτή την περίπτωση δεν είναι μόνιμη, διαρκεί συνήθως λίγες ώρες (Fukuto, 1990). Τα πιο κοινά καρβαμιδικά εντομοκτόνα είναι το proproxi και το bendiocarb.

Τα **πυρεθροειδή εντομοκτόνα**, όπως αναφέρονται στο Κεφ. 1.1.4, εφαρμόζονται σε ενήλικα άτομα των κουνουπιών. Στα πιο κοινά κατά των κουνουπιών περιλαμβάνονται τα alpha-cypermethrin, bifenthrin, cyfluthrin, deltamethrin, permethrin, etofenprox, lambda-cyhalothrin κ.α. Κάποια πυρεθροειδή εντομοκτόνα χρησιμοποιούνται και σε συνδυασμό με το συνεργιστή<sup>2</sup> PBO.

Οι **σπινোসίνες**, όπως αναφέρονται στο Κεφ. 1.1.4, χρησιμοποιούνται ως προνυμφοκτόνα. Η ευρέως χρησιμοποιούμενη δραστική spinosad χρησιμοποιείται και στην καταπολέμηση των κουνουπιών.

Οι **ρυθμιστές ανάπτυξης** είναι ενώσεις που παρεμβαίνουν στην αύξηση και ανάπτυξη των εντόμων και χρησιμοποιούνται ως προνυμφοκτόνα. Σύμφωνα με το μηχανισμό δράσης του διακρίνονται σε (α) ενώσεις που παρεμβαίνουν ανασταλτικά στη βιοσύνθεση της χιτίνης και (β) ενώσεις που μιμούνται ή ανταγωνίζονται τη δράση των ορμονών νεότητας (ανασκόπηση από Tunaz and Uygun 2004). Οι δραστικές που χρησιμοποιούνται στα κουνούπια είναι οι diflubenzuron, novaluron και pyriproxifen. Οι ρυθμιστές ανάπτυξης δεν είναι τοξικοί για τον άνθρωπο και τα θηλαστικά, δε βλάπτουν τα ωφέλιμα παράσιτα και αρπακτικά και είναι φιλικό προς το περιβάλλον.

---

<sup>2</sup> Συνεργιστής: ουσία που ενισχύει τη δράση ενός εντομοκτόνου. Ο τρόπος δράσης των συνεργιστών περιλαμβάνει την αναστολή της δράσης ενζύμων αποτοξικοποίησης, τη διευκόλυνση της εισόδου του εντομοκτόνου μέσω του επιδερμιδίου κ.α. (Bernard & Philogène, 1993)



## 1.3 Ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα

Η εκτεταμένη χρήση εντομοκτόνων αναπόφευκτα, έχει οδηγήσει σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε γεωργικούς εχθρούς και φορείς ασθενειών, η οποία αποτελεί περιοριστικό παράγοντα στον αποτελεσματικό έλεγχο των πληθυσμών τους.

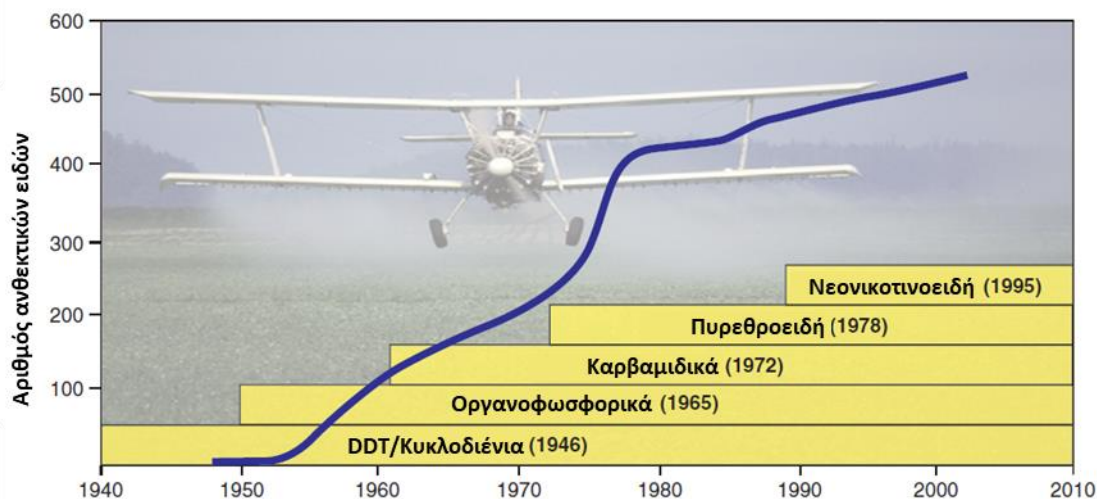
Η ανθεκτικότητα των εντόμων στα εντομοκτόνα ορίζεται, με βάση την Επιτροπή Δράσης για την Ανθεκτικότητα στα Εντομοκτόνα (Insecticide Resistance Action Committee, IRAC), ως η κληρονομούμενη αλλαγή στην ευαισθησία του πληθυσμού ενός εχθρού, η οποία αντικατοπτρίζεται στην επανειλημμένη αποτυχία ενός εντομοκτόνου σκευάσματος να πετύχει τα αναμενόμενα επίπεδα ελέγχου, όταν εφαρμόζεται με βάση τις οδηγίες της ετικέτας του (IRAC, 2021). Όταν ένας πληθυσμός εντόμων εκτεθεί σε ένα εντομοκτόνο, ένα μικρό ποσοστό ατόμων θα επιβιώσει, λόγω της γενετικής ποικιλομορφίας που υπάρχει στον πληθυσμό. Η εφαρμογή της πίεσης επιλογής από την παρουσία του εντομοκτόνου έχει ως αποτέλεσμα η συχνότητα των γονοτύπων που δεν επηρεάζονται από την έκθεση σε αυτό να αυξάνει από γενιά σε γενιά. Μετά από αρκετές γενεές με εφαρμογή της ίδιας πίεσης επιλογής (εντομοκτόνου) ο αριθμός των ανθεκτικών ατόμων αυξάνει στον πληθυσμό με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στον πληθυσμό.

Η ανάπτυξη και εξέλιξη της ανθεκτικότητας σε έναν πληθυσμό εξαρτάται από πάρα πολλούς παράγοντες γενετικής και βιολογικής/οικολογικής προέλευσης, και σίγουρα σχετίζεται και με το επίπεδο έκθεσης στο μέσο επιλεκτικής πίεσης (εντομοκτόνο). Αναμφισβήτητα, η ανθεκτικότητα σε μία πληθώρα εντόμων, όπως π.χ. τα κουνούπια, ευνοείται από το υψηλό αναπαραγωγικό τους δυναμικό και το σύντομο βιολογικό τους κύκλο.

Μετά την εισαγωγή των συνθετικών εντομοκτόνων, σε περισσότερα από 500 είδη εντόμων παγκοσμίως, έχει παρατηρηθεί ανθεκτικότητα (ανασκόπηση από Sparks and Nauen 2015). Η πρώτη περίπτωση ανθεκτικότητας καταγράφηκε το 1946 για το εντομοκτόνο DDT, το οποίο ήταν το πρώτο συνθετικό εντομοκτόνο που χρησιμοποιήθηκε. Τις επόμενες δεκαετίες, ο αριθμός των περιπτώσεων ανθεκτικότητας αυξανόταν συνεχώς, παράλληλα με τη χρήση νέων ομάδων εντομοκτόνων (Εικόνα 1.11). Η πρώτη περίπτωση ανθεκτικότητας στα κουνούπια ήταν το 1947 η εμφάνιση ανθεκτικών ατόμων *Aedes tritaeniorhyncus* και *Aedes sollicitans* στο DDT (Brown, 1986). Για το δάκο της ελιάς, η πρώτη περίπτωση



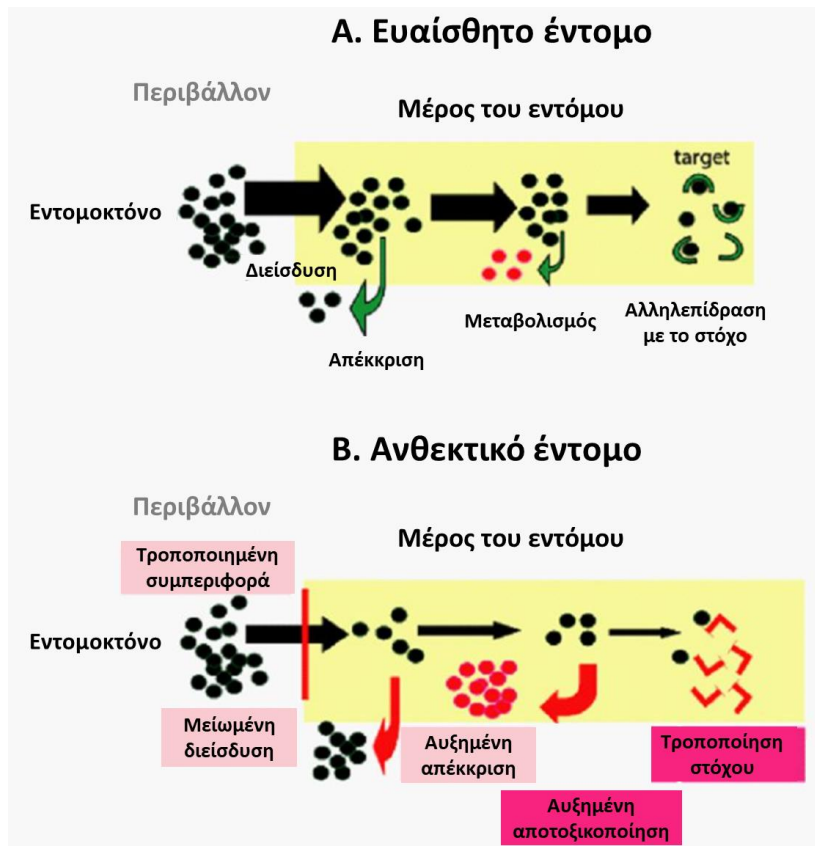
ανθεκτικότητας αναφέρθηκε το 2007 σε πληθυσμούς πεδίου από την Ελλάδα και την Κύπρο, στο οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο dimethoate (Skouras et al., 2007).



**Εικόνα 1.11:** Ο αυξανόμενος αριθμός εντόμων που αποκτούν ανθεκτικότητα στις διάφορες ομάδες εντομοκτόνων σε βάθος δεκαετιών. Οι κίτρινες μπάρες δείχνουν τη χρονική διάρκεια της χρήσης κάθε ομάδας εντομοκτόνων και οι ημερομηνίες στην παρένθεση το έτος της πρώτης εμφάνισης ανθεκτικότητας σε κάθε περίπτωση (Πηγή: Denholm et al. 2002 – τροποποιημένη εικόνα).

### 1.3.1 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Οι κύριοι μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα που έχουν περιγραφεί έως σήμερα συνδέονται με φυσιολογικές και συμπεριφορικές αλλαγές στον οργανισμό των εντόμων και διαχωρίζονται ανάλογα με αυτές σε μεταβολική ανθεκτικότητα, ανθεκτικότητα στόχου, ανθεκτικότητα διείσδυσης και ανθεκτικότητα συμπεριφοράς (Εικόνα 1.12).



**Εικόνα 1.12:** Σχηματική παρουσίαση των φυσιολογικών και συμπεριφορικών αλλαγών που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα. Α) Ευαίσθητο έντομο, Β) Ανθεκτικό έντομο (Πηγή: Corbel and N’Guessan 2013 - τροποποιημένη εικόνα)

### **Μεταβολική ανθεκτικότητα**

Ο μηχανισμός αυτός βασίζεται στα ενζυμικά συστήματα που διαθέτουν τα έντομα για να αποτοξικοποιούν (μετατροπή σε μη τοξική μορφή) ή να απομακρύνουν (μετατροπή σε μία εύκολα αποβαλλόμενη από τον οργανισμό μορφή) εντομοκτόνα. Τα ένζυμα που εμπλέκονται στη μεταβολική ανθεκτικότητα των εντομοκτόνων είναι εκείνα που διαθέτουν τα έντομα για να προστατεύονται και από φυσικές/φυτικές τοξίνες, όπως αλκαλοειδή, τερπένια και φαινόλες. (ανασκόπηση από Panini et al. 2016). Ο ταχύς μεταβολισμός των εντομοκτόνων στα ανθεκτικά έντομα, συμβαίνει είτε γιατί τα ένζυμα εμφανίζουν μεγαλύτερο καταλυτικό ρυθμό, είτε γιατί οι παραγόμενες ποσότητες των ενζύμων είναι μεγαλύτερες.

Η αποτοξικοποίηση μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις φάσεις. Στη φάση I λαμβάνουν χώρα διαδικασίες υδρόλυσης και οξειδωσης στις οποίες συμμετέχουν μονοοξυγενάσες (monooxygenases) (γνωστές και ως P450 μονοοξυγενάσες ή οξειδάσες μικτής λειτουργίας) και εστεράσες (esterases). Στη φάση II, οι μεταφοράσες της

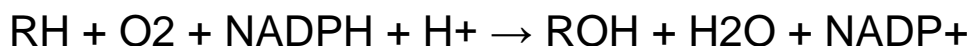
γλουταθειόνης (glutathione-S-transferases, GSTs), οι UDP-γλυκουρονοσυλ-τρανσφεράσες (UDP glucosyltransferases, UGTs) δρουν στα τοξικά παραπροϊόντα της φάσης I. Στη φάση III, οι ABC (Adenosine triphosphate-Binding Cassette) και άλλοι διαμεμβρανικοί μεταφορείς, εξάγουν τις συζευγμένες τοξίνες εκτός του κυττάρου (Bock, 2016; Dermauw et al., 2013; Liu, 2015; Tijet et al., 2001). Ακολουθώς περιγράφονται οι κύριες οικογένειες ενζύμων που σχετίζονται με την αποτοξικοποίηση ξενοβιοτικών ουσιών.

Οι **εστεράσες ή καρβοξυλεστεράσες** εμπλέκονται κυρίως στην ανθεκτικότητα σε ένα ευρύ φάσμα από εντομοκτόνα το οποίο περιλαμβάνει τα οργανοφωσφορικά, καρβαμιδικά και πυρεθροειδή εντομοκτόνα (Li et al. 2007). Τα ένζυμα αυτά συμμετέχουν στο μηχανισμό ανθεκτικότητας είτε δεσμεύοντας πολύ γρήγορα το εντομοκτόνο και στη συνέχεια το απελευθερώνουν αργά, είτε μεταβολίζουν ένα πολύ περιορισμένο εύρος εντομοκτόνων που περιέχουν έναν κοινό εστερικό δεσμό. Η πλειονότητα των εστερασών που δρουν σύμφωνα με την πρώτη περίπτωση παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης όπως έχει βρεθεί στο γένος *Culex* και σε είδη της τάξης των Ημίπτερων (ανασκόπηση από Bass and Field, 2011; Hemingway, 2000).

Οι **μεταφοράσες της γλουταθειόνης (Glutathione S-transferases, GSTs)** εμπλέκονται κυρίως στην ανθεκτικότητα στα οργανοχλωριωμένα, στα οργανοφωσφορικά και στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα. Τα ένζυμα αυτά ανήκουν σε μία υπεροικογένεια η οποία περιέχει τουλάχιστον 25 οικογένειες GST-like πρωτεϊνών. Εμπλέκονται στην αποτοξικοποίηση είτε άμεσα, είτε μεταβολίζοντας δευτερογενή προϊόντα που παράγονται από άλλα ένζυμα αποτοξικοποίησης, όπως P450 οξειδάσες ή εστεράσες. Η δράση τους ευθύνεται για την ανθεκτικότητα με διάφορους τρόπους: (α) με την προσθήκη ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στο εντομοκτόνο ή στα κύρια μεταβολικά προϊόντα του, (β) με την κατάλυση της αντίδρασης απουδροχλωρίνωσης του DDT, στην οποία η γλουταθειόνη δρα ως συμπαραγοντας (αυτός είναι και ο πιο κοινός μηχανισμός ανθεκτικότητας των κουνουπιών στο DDT), (γ) με δράση περοξειδάσης μπορούν να προσφέρουν προστασία κατά των δευτερογενών επιδράσεων της έκθεσης σε εντομοκτόνα, όπως το οξειδωτικό στρες. (δ) δεσμεύουν τα εντομοκτόνα, μειώνοντας τη ποσότητα του εντομοκτόνου που φτάνει στο στόχο (ανασκόπηση από Pavlidi et al., 2018b).

Οι **μονοοξυγενάσες του κυτοχρώματος P450** που κωδικοποιούνται από τα γονίδια CYP συναντώνται σε όλους τους οργανισμούς και είναι μία σημαντική και ποικιλόμορφη οικογένεια ενζύμων που περιέχουν αίμη. Τα ένζυμα αυτά, αν και

καταλύουν τουλάχιστον 60 διαφορετικές χημικές αντιδράσεις, είναι κυρίως γνωστά για την αντίδραση με την οποία δεσμεύουν μοριακό οξυγόνο και αντλούν ηλεκτρόνια από το NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate), για να εισάγουν ένα μόριο οξυγόνου στο υπόστρωμα τους. Η στοιχειομετρία της αντίδρασης είναι:



Η μεταφορά του NADPH στην P450 γίνεται από την αναγωγή NADPH-κυτοχρώματος P450 (Cytochrome P450 reductase, CPR) ή/και από το κυτόχρωμα b5 (ανασκόπηση από Feyereisen, 2012).

Πολλές P450 πρωτεΐνες εξειδικεύονται στο μεταβολισμό ενδογενών υποστρωμάτων, όπως ορμόνες, λιπίδια κ.α., όμως φημίζονται κυρίως για το μεταβολισμό/αποτοξικοποίηση ξενοβιοτικών ουσιών και κατ' επέκταση για την εμπλοκή τους στην ανθεκτικότητα σε πολλές ομάδες εντομοκτόνων, συμπεριλαμβανομένων των καρβαμιδικών, οργανοφωσφορικών, πυρεθροειδών και νεονικοτινοειδών εντομοκτόνων (ανασκόπηση από Li et al. 2007). Έως σήμερα, πάνω από 600 γονίδια P450 πρωτεϊνών έχουν χαρακτηριστεί και σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα και τα περισσότερα ανήκουν στις οικογένειες *CYP4*, *CYP6*, *CYP9* και *CYP12*. Οι περισσότερες περιπτώσεις ανθεκτικότητας συνδέονται με υπερέκφραση των P450 γονιδίων, μέσω αυξημένης γονιδιακής ρύθμισης, όμως επίσης περιπτώσεις γονιδιακής ενίσχυσης και ποιοτικών αλλαγών έχουν αναφερθεί (ανασκόπηση από Panini et al. 2016).

### **Ανθεκτικότητα στόχου**

Όπως έχει αναφερθεί, τα εντομοκτόνα δρουν σε συγκεκριμένες θέσεις (στόχους) στον οργανισμό του εντόμου όπως για παράδειγμα στο νευρικό σύστημα. Λόγω μεταλλαγών στο γονιδίωμα, ο στόχος τους μπορεί να τροποποιηθεί, ώστε τα εντομοκτόνα να μην μπορούν να δεσμευτούν αποτελεσματικά σε αυτόν (ανασκόπηση από Feyereisen, 1995). Στις πιο κοινές και καλά μελετημένες τροποποιήσεις του στόχου του εντομοκτόνου ανήκουν εκείνες που οφείλονται σε μεταλλαγές στα γονίδια της ακετυλοχολινεστεράσης (στόχος οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών εντομοκτόνων), του γονιδίου του καναλιού νατρίου (στόχος DDT και πυρεθροειδών εντομοκτόνων) και του γονιδίου του υποδοχέα του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (στόχος κυκλοδιενίων) (ανασκόπηση από Feyereisen et al. 2015).

### **Ανθεκτικότητα διείσδυσης**

Η ανθεκτικότητα διείσδυσης αφορά τη καθυστέρηση της απορρόφησης του εντομοκτόνου ή τη μειωμένη διείσδυσή του στον οργανισμό του εντόμου, που οφείλεται σε φυσικοχημικές αλλαγές στη δομή του επιδερμιδίου (cuticle) του.

Το επιδερμίδιο εξυπηρετεί ποικίλες λειτουργίες όπως, προστασία από αφυδάτωση, αισθητήρια αντίληψη του περιβάλλοντος, μηχανική υποστήριξη και κινητικότητα. Επιπλέον, αποτελεί το πρώτο εμπόδιο για την προστασία του εντόμου από ξένες ουσίες (Wan et al., 2016).

Ο μηχανισμός ανθεκτικότητας του επιδερμιδίου προστατεύει τα έντομα από ένα ευρύ φάσμα εντομοκτόνων, όμως μόνος του θεωρείται ότι αποδίδει χαμηλά επίπεδα ανθεκτικότητας. Ωστόσο, συχνά συναντάται σε συνδυασμό με άλλες μορφές ανθεκτικότητας, ενισχύοντας τις επιδράσεις τους (Kasai et al., 2014; Scott, 1990; Strycharz et al., 2013). Αυτό το είδος ανθεκτικότητας έχει μέχρι τώρα σχετιστεί κυρίως με περιπτώσεις ανθεκτικότητας σε πυρεθροειδή εντομοκτόνα αλλά επίσης και με το DDT και το νεονικοτινοειδές εντομοκτόνο imidacloprid (ανασκόπηση από Balabanidou et al. 2018).

### **Ανθεκτικότητα συμπεριφοράς**

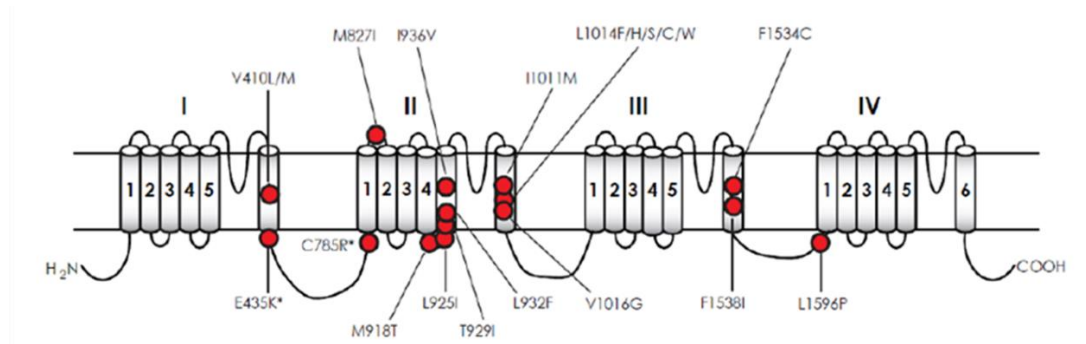
Η ανθεκτικότητα συμπεριφοράς είναι αποτέλεσμα της αλλαγής στη συμπεριφορά του εντόμου ώστε να αποφύγει την έκθεση στο εντομοκτόνο. Η αλλαγή αυτή βασίζεται σε ερεθίσματα τα οποία μπορούν να αναγνωριστούν από τα έντομα και να απομακρυνθούν από τον τοξικό παράγοντα (ανασκόπηση από Gattton et al., 2013). Οι μηχανισμοί που οδηγούν σε αυτή την αλλαγή δεν έχουν ακόμα διευκρινιστεί, αν και υπάρχουν κάποιες σχετικές μελέτες που δείχνουν ότι γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες παίζουν καθοριστικό ρόλο (ανασκόπηση από Riveron et al. 2018).

## **1.3.2 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα**

Οι κύριοι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα είναι τα ένζυμα αποτοξικοποίησης, P450 μονοοξυγενάσες, GSTs και

εστεράσες (ανασκόπηση από Li et al. 2007), και οι μεταλλαγές στο γονίδιο του καναλιού νατρίου (ανασκόπηση από Dong et al. 2014).

Η ανθεκτικότητα στόχου στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα σχετίζεται κυρίως με μεταλλαγές (γνωστές ως *kdr* μεταλλαγές) στο γονίδιο που κωδικοποιεί για το κανάλι νατρίου (Voltage gated sodium channel, VGSC), που αποτελεί το στόχο των εντομοκτόνων αυτών. Μεταξύ των *kdr* μεταλλαγών (Εικόνα 1.14), η αντικατάσταση μίας λευκίνης με φαινυλαλανίνη στη θέση 1014, στο έκτο τμήμα της περιοχής II (II S6) του γονιδίου, πρώτη φορά βρέθηκε σε ανθεκτική στα πυρεθροειδή οικιακή μύγα *Musca domestica* και στη Γερμανική κατσαρίδα *Blattella germanica* (ανασκόπηση από Rinkevich et al. 2013). Στη συνέχεια, ποικίλες αντικαταστάσεις αμινοξέων στην ίδια θέση έχουν βρεθεί σε ανθεκτικούς πληθυσμούς διαφόρων εντόμων (ανασκόπηση από Dong et al. 2014). Επίσης, διαφορετικές μεταλλαγές έχουν βρεθεί σε άλλες θέσεις (Εικόνα 1.14).



**Εικόνα 1.13: Μεταλλαγές ανθεκτικότητας στα κανάλια νατρίου, οι οποίες προσδίδουν ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα (Πηγή: Dong et al. 2014)**

Στα κουνούπια έχουν βρεθεί αρκετές μεταλλαγές στο γονίδιο VGSC. Η μεταλλαγή L1014F όταν βρίσκεται σε ομοζυγώτη κατάσταση έχει σχετισθεί με ανθεκτικούς φαινότυπους, ιδίως όταν συνδυάζεται με μεταβολική ανθεκτικότητα που προσδίδεται από P450 μονοοξυγενάσες (Edi et al., 2012). Επίσης, οι μεταλλαγές F1534S/L/C, I1532T και V1016G έχουν σχετισθεί με απώλεια της ευαισθησίας σε πυρεθροειδή εντομοκτόνα, βάσει μελετών in vitro λειτουργικού χαρακτηρισμού (Du et al., 2013; Samantsidis et al., 2020).

Πειράματα με συνεργιστές και ανάλυση μικροσυστοιχιών έχουν δείξει την εμπλοκή P450 μονοοξυγενασών στο δάκο, στην ανθεκτικότητα στο alpha-cypermethrin, σε ανθεκτικούς πληθυσμούς από την Ελλάδα (Margaritoroulos et al., 2008; Pavlidi et al., 2018a). Ομοίως, στη μύγα της Μεσογείου (*Ceratitis capitata*), η CYP6A51 σχετίσθηκε

με την ανθεκτικότητα στο εντομοκτόνο lambda-cyhalothrin (Arouri et al., 2015), η οποία στη συνέχεια φάνηκε ότι μεταβολίζει πυρεθροειδή εντομοκτόνα και η λειτουργική της ανάλυση έδειξε ότι συμβάλλει στην ανθεκτικότητα σε αυτά (Tsakireli et al., 2019). Αντίστοιχα, αρκετές P450 μονοοξυγενάσες έχουν βρεθεί επίσης να υπεκφράζονται σε κουνούπια ανθεκτικά στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα, κάποιες εκ των οποίων έχουν χαρακτηριστεί και έχει φανεί ότι μεταβολίζουν τις ουσίες αυτές και συνεισφέρουν στο φαινότυπο της ανθεκτικότητας (ανασκόπηση από Vontas et al., 2020).

Οι GSTs επίσης σε κάποιες περιπτώσεις έχουν σχετιστεί με την ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα σε κουνούπια και εχθρούς γεωργικής σημασίας, παρ' όλα αυτά είναι ελάχιστες αυτές που έχει επιβεβαιωθεί ότι μεταβολίζουν πυρεθροειδή εντομοκτόνα ή έχει διευκρινιστεί ο μηχανισμός με τον οποίο εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα (ανασκόπηση από Pavlidi et al., 2018).

Επιπλέον, η ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα έχει σχετισθεί με τη δομή και τη σύνθεση του επιδερμίδιου, σε γεωργικούς εχθρούς και φορείς ασθενειών. Μειωμένη διείσδυση εντομοκτόνου και πιο παχύ επιδερμίδιο έχει παρατηρηθεί σε περιπτώσεις ανθεκτικών σε πυρεθροειδή εντομοκτόνα εντόμων, όπως για παράδειγμα στο *Helicoverpa armigera* (Ahmad et al., 2006), στο *Anopheles funestus* (Wood et al., 2010) και στο *Bactrocera dorsalis* (Lin et al., 2012). Επιπλέον μελέτες μεταγραφώματος σε κουνούπια, έχουν δείξει σταθερή υπερέκφραση πολλών γονιδίων που σχετίζονται με το επιδερμίδιο (εμπλέκονται στη βιοσύνθεση λιπιδίων και το μεταβολισμό λιπαρών οξέων) (Fang et al., 2015; Jones et al., 2013; Vontas et al., 2007).

### **1.3.3 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα**

Η ακετυλοχολινεστεράση είναι η θέση δράσης των οργανοφωσφορικών και των καρβαμιδικών εντομοκτόνων. Τα περισσότερα έντομα έχουν δύο γονίδια ακετυλοχολινεστεράσης (*ACE 1* και *ACE 2*), όμως πολλά ανώτερα Δίπτερα έχουν μόνο ένα γονίδιο, το *ACE* (Huchard et al., 2006), το οποίο κωδικοποιεί για την ακετυλοχολινεστεράση, και διάφορες σημειακές μεταλλαγές έχουν περιγραφεί σε ανθεκτικά σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα έντομα (Fournier, 2005). Σε ανθεκτικά στελέχη *Culex pipiens* και *Anopheles gambiae* έχει βρεθεί ότι το *ACE 1* γονίδιο σχετίζεται με την ανθεκτικότητα. Πιο συγκεκριμένα, η ανθεκτικότητα σε

οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα αποδίδεται κυρίως στην αντικατάσταση της γλυκίνης, που βρίσκεται στη βάση του ενεργού κέντρου του ενζύμου, με σερίνη στη θέση 119 (G119S) (Weill et al., 2003). Στο δάκο είναι γνωστές δύο σημειακές μεταλλαγές, η G488S και η I214V (αναφέρονται αναλυτικά στο επόμενο κεφάλαιο) και μία έλλειψη 9 νουκλεοτιδίων (Δ3Q) που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (ανασκόπηση από (Vontas et al., 2011).

Στη μεταβολική ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα εμπλέκονται και οι τρεις ομάδες ενζύμων αποτοξικοποίησης (GSTs, εστεράσες, P450 μονοοξυγενάσες). Στην οικογένεια Tephritidae, κυρίως η εμπλοκή εστερασών έχει αναφερθεί, δρώντας μέσω δέσμησης και απομάκρυνσης του εντομοκτόνου, όμως επίσης έχουν αναφερθεί P450s και GSTs οι οποίες είναι ικανές να μεταβολίζουν εντομοκτόνα (Pavliidi et al., 2018b; Vontas et al., 2011). Ομοίως, στα κουνούπια, και ιδιαίτερα στο γένος *Culex*, οι εστεράσες κυρίως, έχουν συνδεθεί με την ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (ανασκόπηση από Hemingway et al. 2004).

### **1.3.4 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας στους ρυθμιστές ανάπτυξης (diflubenzuron)**

Το diflubenzuron είναι μέλος της ομάδας των ρυθμιστών ανάπτυξης και δρα παρεμποδίζοντας τη βιοσύνθεση της χιτίνης, επιδρώντας στην ανάπτυξη των εντόμων. Οι περιπτώσεις ανάπτυξης ανθεκτικότητας στο diflubenzuron είναι σχετικά λίγες, όμως παρ' όλα αυτά έχει αναφερθεί σε έντομα γεωργικής σημασίας και σε κουνούπια (Grigoraki et al., 2017; Sauphanor et al., 2000). Ο φαινότυπος της ανθεκτικότητας σε κουνούπια *Culex pipiens*, ο οποίος μάλιστα είναι αρκετά έντονος, έχει συνδεθεί με δύο σημειακές μεταλλαγές στο γονίδιο της συνθάσης της χιτίνης που οδηγεί σε αντικατάσταση της ισολευκίνης στη θέση 1043 με μεθειονίνη ή λευκίνη (Grigoraki et al., 2017).

### **1.3.5 Διαχείριση ανθεκτικότητας**

Ο αντίκτυπος της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα έχει αρκετές προεκτάσεις, οικονομικής, οικολογικής και υγειονομικής φύσεως. Οι οικονομικές απώλειες παγκοσμίως είναι τεράστιες, λόγω των γεωργικών εχθρών και φτάνουν έως και το 26%



ετησίως, που αντιστοιχούν σε πάνω από 400 δις δολάρια (Culliney, 2014). Η υπερβολική χρήση εντομοκτόνων σαν άμεση αντίδραση στην εμφάνιση ανθεκτικότητας, επιδεινώνει το πρόβλημα, μολύνει το περιβάλλον, υποβαθμίζει την ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων και αυξάνει το κόστος της καταπολέμησης των εχθρών. Επιπλέον, φαίνεται αναπόφευκτο ότι αν δεν υπάρξουν δραστικές αλλαγές, η ανθεκτικότητα θα οδηγήσει στην επανεμφάνιση ασθενειών που μεταδίδονται με φορείς, παρ' όλο που οι ακριβείς επιδημιολογικές συνέπειες της ανθεκτικότητας δεν έχουν διευκρινιστεί (Sternberg and Thomas, 2017).

Ο χρόνος, η προσπάθεια και το τεράστιο κόστος που απαιτείται για την ανακάλυψη και ανάπτυξη νέων ουσιών για την καταπολέμηση γεωργικών εχθρών και εντόμων υγειονομικής σημασίας επιτάσσει την ελαχιστοποίηση των πιθανοτήτων ανάπτυξης και του ρυθμού εξέλιξης της ανθεκτικότητας στα ήδη χρησιμοποιούμενα εντομοκτόνα, δεδομένου ότι εναλλακτικές ουσίες με παρόμοια χαρακτηριστικά και τόσο χαμηλό κόστος είναι πολύ δύσκολο να βρεθούν (Sparks and Nauen, 2015).

Για τους παραπάνω λόγους, καθίσταται απαραίτητη η ανάπτυξη αποτελεσματικών στρατηγικών διαχείρισης της ανθεκτικότητας. Οι στρατηγικές αυτές μπορεί να διαφέρουν ανάλογα τον εχθρό ή το φορέα που στοχεύουμε, δεδομένου ότι εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη βιολογία και την οικολογία του κάθε είδους, όμως σε κάθε περίπτωση ακολουθούν κάποιες βασικές αρχές (Sternberg and Thomas, 2017; WHO, 2012). Οι αρχές αυτές περιλαμβάνουν:

- 1) το συντονισμένο σχεδιασμό και εφαρμογή προγραμμάτων καταπολέμησης που περιλαμβάνουν την ολοκληρωμένη καταπολέμηση του εχθρού (εφαρμογή συνδυασμού μεθόδων καταπολέμησης με σκοπό τον περιορισμό της χρήσης εντομοκτόνων) και την εφαρμογή ποικίλων, ως προς τον τρόπο δράσης εντομοκτόνων
- 2) την παρακολούθηση της εξέλιξης της ανθεκτικότητας στους πληθυσμούς στόχους με τα διαθέσιμα εργαλεία
- 3) την ανάπτυξη νέων μεθόδων/ουσιών καταπολέμησης
- 4) τη διερεύνηση των μηχανισμών και των επιδράσεων της ανθεκτικότητας στις εφαρμογές στο πεδίο και τον υπολογισμό των συνεπειών της στα προγράμματα ολοκληρωμένης καταπολέμησης, και τέλος
- 5) την εξασφάλιση των απαραίτητων πόρων και την υποστήριξη όλων των εμπλεκόμενων φορέων/προσώπων ώστε να επιτευχθούν όλα τα παραπάνω

### 1.3.5.1 Μέθοδοι παρακολούθησης της ανθεκτικότητας

Ένα σύνολο μεθόδων έχει αναπτυχθεί και είναι σήμερα διαθέσιμες για την παρακολούθηση της ανθεκτικότητας σε γεωργικούς εχθρούς και φορείς ασθενειών.

#### Βιοδοκιμές

Οι βιοδοκιμές ή αλλιώς δοκιμές τοξικότητας, εκτιμούν το φαινότυπο της ανθεκτικότητας ανεξάρτητα από τους μοριακούς μηχανισμούς που μπορεί να υποβόσκουν σε κάθε περίπτωση. Οι μέθοδοι βιοδοκιμών είναι πολλές και διαφορετικές και η επιλογή της μεθόδου εξαρτάται από το ηλικιακό στάδιο και το είδος του εχθρού/φορέα που ελέγχεται. Οι βιοδοκιμές παρέχουν δεδομένα τα οποία σχετίζονται περισσότερο από κάθε άλλη μέθοδο με την εφαρμογή στο πεδίο, εν τούτοις έχουν περιορισμούς, όπως για παράδειγμα η έντονη διακύμανση μεταξύ των πειραμάτων ή σε πολλές περιπτώσεις όπως στα κουνούπια και στο δάκο, η απόκλιση της μεθόδου που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο σε σχέση με τη μέθοδο που χρησιμοποιείται στο πεδίο, μη επιτρέποντας την εκτίμηση των συνεπειών της ανθεκτικότητας στο πεδίο.

#### Μοριακές μέθοδοι

Η πλειονότητα των μοριακών διαγνωστικών μεθόδων βασίζονται στη στοχευμένη διερεύνηση των νουκλεϊκών οξέων (RNA και DNA). Οι μέθοδοι αυτές είναι κατάλληλες για την ανίχνευση γνωστών ή/και νέων μεταλλαγών ανθεκτικότητας ή για την ανίχνευση της διαφοροποίησης της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα. Ποικίλουν ανάλογα με την εφαρμογή τους, σε α) εκείνες που εφαρμόζονται σε ένα μικρό αριθμό ατόμων, όπως η AS-PCR, η PCR-RFLP, η LAMP και η αλληλούχιση κατά Sanger και β) εκείνες που μπορούν να εφαρμοστούν σε πολύ μεγαλύτερο αριθμό ατόμων (χωρισμένα σε ομάδες άτομα - pools) όπως οι rtPASA/SYBR Green qPCR, TaqMan qPCR και πυροαλληλούχιση (pyrosequencing) (ανασκόπηση από Van Leeuwen et al., 2020). Στον Πίνακα 1.3 παρουσιάζονται οι μοριακές διαγνωστικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται ευρέως σήμερα.

**Πίνακας 1. 3: Μοριακές διαγνωστικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της ανθεκτικότητας. (Πηγή: [\(Van Leeuwen et al. 2020](#) – τροποποιημένος πίνακας)**

Μέθοδος	Εφαρμογή	Πλεονεκτήματα (+) / Μειονεκτήματα (-)
AS-PCR PCR-LFLP	<ul style="list-style-type: none"> <li>●Ανθεκτικότητα στόχου</li> <li>●Ανίχνευση μεταλλαγών</li> <li>●Ανίχνευση μεμονωμένων γενοτύπων</li> </ul>	+ Εφαρμόζεται σε βασικές εργαστηριακές εγκαταστάσεις + Απλή, χαμηλού κόστους - Χαμηλής ακρίβειας (AS-PCR) - Εφαρμογή σε μικρό αριθμό ατόμων - Χρονοβόρα
TaqMan HRM ανάλυση	<ul style="list-style-type: none"> <li>●Ανθεκτικότητα στόχου</li> <li>●Ανίχνευση μεμονωμένων γενοτύπων</li> <li>●Ποσοτικοποίηση συχνότητας μεταλλαγών</li> <li>●Μεταβολική ανθεκτικότητα</li> </ul>	+ Εφαρμογή σε μεγάλο αριθμό ατόμων + Εύκολη εφαρμογή και ανάγνωση αποτελεσμάτων - Υψηλό κόστος εξοπλισμού
Αλληλούχιση/ Πυροαλληλούχιση	<ul style="list-style-type: none"> <li>●Ανθεκτικότητα στόχου</li> <li>●Ανίχνευση μεταλλαγών</li> <li>●Ανίχνευση μεμονωμένων γενοτύπων</li> </ul>	+ Ανίχνευση νέων μεταλλαγών ανθεκτικότητας - Υψηλό κόστος - Πολλαπλών σταδίων πρωτόκολλο, δεν ενδείκνυται για εφαρμογή σε πολλά άτομα
LAMP	<ul style="list-style-type: none"> <li>●Ανθεκτικότητα στόχου</li> <li>●Ανίχνευση μεταλλαγών</li> <li>●Ανίχνευση μεμονωμένων γενοτύπων</li> </ul>	+ Δεν απαιτείται θερμικός κυκλοποιητής, χαμηλού κόστους + Εύκολη και γρήγορη εφαρμογή/ανάγνωση αποτελέσματος + Μπορεί να εφαρμοστεί στο πεδίο - Πολύπλοκος και περιορισμένων δυνατοτήτων σχεδιασμός της μεθόδου - Χαμηλής ακρίβειας, δεν παρέχει ποσοστικά δεδομένα

Επιπλέον, πολλά υποσχόμενες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί ή αναπτύσσονται οι οποίες χαρακτηρίζονται από εξαιρετική ακρίβεια, δύνανται να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο μεγάλων δειγμάτων (που αποτελούνται από μεγάλο αριθμό ατόμων), αλλά και χρήση του ίδιου δείγματος για ανίχνευση μεταβολικής και ανθεκτικότητας στόχου, όπως η Droplet Digital PCR (ddPCR) (Mavridis et al., 2018b).

### 1.3.5.2 Μέθοδοι διερεύνησης των μηχανισμών ανθεκτικότητας

Η διερεύνηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας περιλαμβάνει την αναγνώριση του φαινοτύπου της ανθεκτικότητας σε πληθυσμούς που έχουν υποστεί πίεση επιλογής είτε στο πεδίο είτε στο εργαστήριο. Αυτό συνήθως διαπιστώνεται με βιοδοκιμές τοξικότητας στον υπό μελέτη πληθυσμό και κατ' επέκταση με βιοδοκιμές τοξικότητας

με συνεργιστικές ουσίες, οι οποίες αναστέλλουν τη δράση ενζύμων αποτοξικοποίησης, ώστε να βεβαιωθεί ή να απορριφθεί η εμπλοκή μηχανισμών μεταβολικής ανθεκτικότητας.

Ακολούθως, είναι σημαντική η μοριακή ή βιοχημική ανάλυση για την αναγνώριση υποψήφιων γονιδίων ή/και μεταλλαγών ή/και ενζύμων που σχετίζονται με το φαινότυπο της ανθεκτικότητας. Σε μοριακό επίπεδο οι μέθοδοι που εφαρμόζονται περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, την αλληλούχιση γονιδίων-στόχων των εντομοκτόνων για την εύρεση μεταλλαγών που έχουν οδηγήσει σε αλλαγή της διαμόρφωσης του στόχου (εφόσον είναι γνωστός), ανάλυση μεταγραφώματος/γονιδιώματος για τον έλεγχο της διαφοροποιημένης έκφρασης γονιδίων στα ανθεκτικά άτομα, την εύρεση μεταλλαγών, τη μελέτη του γενετικού προφίλ κ.α.. Η βιοχημική ανάλυση περιλαμβάνει τη μέτρηση της δραστηριότητας συγκεκριμένων ομάδων ενζύμων που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα ή/και ακόμα τον αυξημένο μεταβολισμό εντομοκτόνων.

Τέλος, σημαντικό κομμάτι αποτελεί ο χαρακτηρισμός των υποψήφιων γονιδίων/μεταλλαγών ή ενζύμων/πρωτεϊνών που έχουν βρεθεί να σχετίζονται με την ανθεκτικότητα, ώστε να διαλευκανθεί ο ρόλος τους στο φαινότυπο της ανθεκτικότητας. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σε αυτή την περίπτωση, μεταξύ άλλων περιλαμβάνουν, *in vitro* μελέτες μεταβολισμού μέσω ετερόλογης έκφρασης γονιδίων αποτοξικοποίησης, και *in vivo* λειτουργικές μελέτες ανάλυσης του ρόλου γονιδίων αποτοξικοποίησης ή/και μεταλλαγών ανθεκτικότητας μέσω της τεχνικής του RNAi ή διαγονιδιακών τεχνικών, όπως τα συστήματα GAL4/UAS και CRISPR/Cas9 (ανασκόπηση από Homem and Davies 2018).

## 1.4 Αντικείμενο της εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η παρακολούθηση του φαινομένου της ανθεκτικότητας του δάκου και εντόμων υγειονομικής σημασίας, και παράλληλα, η διερεύνηση μηχανισμών ανθεκτικότητας, με απώτερο στόχο τη συγκέντρωση επιστημονικών δεδομένων που αφορούν την ανθεκτικότητα, τα οποία μπορούν να συμβάλλουν στη βέλτιστη διαχείρισή και αντιμετώπισή της. Στα πλαίσια της εργασίας εφαρμόστηκαν κλασσικές μέθοδοι, όπως οι βιοδοκιμές τοξικότητας, καθώς επίσης και πιο σύγχρονες μοριακές και αναλυτικές μέθοδοι.

Πιο συγκεκριμένα, η διατριβή περιλαμβάνει 4 κεφάλαια:

1. Την παρακολούθηση της εξέλιξης της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα, σε άγριους πληθυσμούς δάκου, *Bactrocera oleae*, και τον αντίκτυπό της στις εφαρμογές στο πεδίο.
2. Τη διερεύνηση του μηχανισμού ανθεκτικότητας του δάκου στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα.
3. Την ανάλυση του μηχανισμού ανθεκτικότητας διείσδυσης στον κύριο φορέα της ελονοσίας, *Anopheles gambiae*.
4. Την ανάλυση της πληθυσμιακής σύστασης και παρακολούθηση της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα, ελληνικών πληθυσμών κουνουπιών από το νησί της Κρήτης.

## **Κεφάλαιο 2: Ανθεκτικότητα του δάκου στα εντομοκτόνα: εξέλιξη φαινομένου στην Ελλάδα και η επίδρασή της στην αποτελεσματικότητα των ψεκασμών.**

Αυτό το κεφάλαιο αναδιατυπώθηκε από το:

Kampouraki A, Stavrakaki M., Karataraki A., Katsikogiannis G., Pitika E., Varikou K., Vlachaki A., Chrysargyris A., Malandraki E., Sidiropoulos N., Paraskevopoulos A., Gkilpathi D., Roidakis E. & Vontas J. Recent evolution and operational impact of insecticide resistance in olive fruit fly *Bactrocera oleae* populations from Greece. *J Pest Sci* **91**: 1429– 1439 (2018).

## 2.1 Εισαγωγή

Ο δάκος είναι ο πιο σημαντικός εχθρός της ελιάς παγκοσμίως. Στην Ελλάδα οι οικονομικές απώλειες κάθε χρόνο, λόγω του δάκου, φτάνουν το 30% της συνολικής παραγωγής. Στην Κρήτη, όπου το 65% της γεωργικής γης καλύπτεται από ελαιόδεντρα, οι οικονομικές απώλειες υπολογίζονται σε πάνω από 20 εκατ. ευρώ ετησίως.

Η καταπολέμηση του δάκου παγκοσμίως, βασίζεται κυρίως στη χρήση χημικών εντομοκτόνων και παγίδων, και δευτερευόντως στην εφαρμογή συντηρητικού βιολογικού ελέγχου, την τεχνική του στείρου εντόμου και κάποια φυσικά μέσα (ανασκόπηση από Pinheiro et al. 2020). Η τεχνική του στείρου εντόμου βασισμένη στην τεχνολογία RIDL (Release of Insects carrying a Dominant Lethal) (Ant et al., 2012) είναι αρκετά υποσχόμενη, όμως η χρήση Γενετικά Τροποποιημένων Οργανισμών (GMOs, Genetically Modified Organisms) στον τομέα της γεωργίας, δεν έχει ακόμα επιτραπεί στις περισσότερες χώρες της Ευρώπης. Επομένως, στις χώρες της Μεσογείου, και ιδίως στην Ελλάδα, η καταπολέμηση γίνεται κυρίως με χημικά μέσα.

Η καταπολέμηση στην Ελλάδα βασίζεται στο σημαντικότερο μέρος σε δολωματικούς ψεκασμούς που διενεργούνται με ευθύνη των Διευθύνσεων Αγροτικής Οικονομίας και Κτηνιατρικής και συντονίζονται σε Εθνικό επίπεδο από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων. Ο αριθμός των εφαρμογών διαφέρει στις διάφορες περιοχές. Για αρκετές δεκαετίες εφαρμόζονταν οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, τελευταία οι δραστικές dimethoate και fenthion, ενώ τα τελευταία 10-15 χρόνια έχουν εισαχθεί στη λίστα με τα εντομοκτόνα και πυρεθροειδή, όπως τα alpha-cypermethrin, η σπινουσίνη spinosad και νεονικοτινοειδή όπως το thiacloprid. Αυτά τα εντομοκτόνα χρησιμοποιούνται κυρίως στους δολωματικούς ψεκασμούς, όμως υπάρχουν περιπτώσεις που γίνονται και ψεκασμοί κάλυψης με κάποια από αυτά τα σκευάσματα (πυρεθροειδή, οργανοφωσφορικά και νεονικοτινοειδή).

Η έντονη χρήση των εντομοκτόνων για την καταπολέμηση του δάκου, έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη της «ανθεκτικότητας πεδίου» η οποία ορίζεται ως «η γενετικά βασισμένη μείωση της ευαισθησίας σε ένα εντομοκτόνο σε έναν πληθυσμό, η οποία προκαλείται από την έκθεση στο συγκεκριμένο εντομοκτόνο στο πεδίο» (Tabashnik et al., 2014). Παρ' όλα αυτά, λόγω της υψηλής κινητικότητας του δάκου και της τάσης των πληθυσμών του να διασπείρονται χωροταξικά, η ανθεκτικότητα φαίνεται ακόμα να βρίσκεται σε μέτρια επίπεδα, συγκριτικά με άλλα έντομα (Vontas et al., 2011). Στην

πραγματικότητα, δεν είναι γνωστό εάν η ανθεκτικότητα που έχει διαπιστωθεί σε εργαστηριακά πειράματα, φτάνει τα επίπεδα «πρακτικής ανθεκτικότητας» (Tabashnik et al., 2014), δηλαδή, «εάν η ανθεκτικότητα πεδίου που έχει δημιουργηθεί μειώνει στην πραγματικότητα την αποτελεσματικότητα των σκευασμάτων που εφαρμόζονται και έχει πρακτικές συνέπειες στην καταπολέμηση του εχθρού».

Η ανθεκτικότητα στο dimethoate ήταν αυτή που αναγνωρίστηκε πρώτη στο δάκο, και σχετίστηκε με τροποποίηση του στόχου. Οι μεταλλαγές ανθεκτικότητας στόχου που έχουν βρεθεί στο γονίδιο boAChE, είναι η έλλειψη Δ3Q και δύο υποκαταστάσεις ενός αμινοξέος, η G488S και η I214V, ομόλογες της G396 του *Torpedo californica* και της I199V μεταλλαγής ανθεκτικότητας της *Drosophila melanogaster* αντίστοιχα (ανασκόπηση από Vontas et al. 2011). Οι συχνότητες αυτών των μεταλλαγών έχουν βρεθεί σε αρκετά υψηλά επίπεδα στο παρελθόν στην Ελλάδα, όπου τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως (Margaritoroulos et al., 2008; Nardi et al., 2005).

Ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα έχει επίσης αναφερθεί σε πληθυσμούς δάκου από την Ελλάδα. Μία συστηματική μελέτη παρακολούθησης της ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα στην Ελλάδα πραγματοποιήθηκε κατά τα έτη 2003-2006 από τους Margaritoroulos et al. (2008). Ανθεκτικότητα στη δραστική ουσία alpha-cypermethrin καταγράφηκε σε πληθυσμούς από την Ελλάδα, με τις μέσες θανατηφόρες δόσεις να φτάνουν έως και 3,28 ng/insect. Ενισχυμένη δράση μικτής δράσης οξειδασών, συνδέθηκε με την ανθεκτικότητα στο alpha-cypermethrin, στους ανθεκτικούς πληθυσμούς.

Πληθυσμοί από την Ελλάδα, την Κύπρο και την Καλιφόρνια έχουν ελεγχθεί για πιθανή ανθεκτικότητα στο spinosad, όμως μόνο χαμηλά επίπεδα ανθεκτικότητας (4-13 φορές) βρέθηκαν σε κάποιους πληθυσμούς δάκου από την Καλιφόρνια, όπου η δραστική αυτή χρησιμοποιούνταν για περίπου 10 χρόνια και οι κλιματολογικές συνθήκες είναι παρόμοιες με αυτές της Μεσογείου (Kakani et al., 2010).

Τέλος, καμία αναφορά δεν υπάρχει για εμφάνιση ανθεκτικότητας του δάκου στα νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα ή σε άλλα είδη της οικογένειας Tephritidae.

Σε αντίθεση με άλλα είδη εχθρών, όπως τα ακάρεα, οι αλευρώδεις και οι αφίδες, για τα οποία υπάρχουν μέθοδοι προσδιορισμού της υφιστάμενης ανθεκτικότητας οι οποίες σχετίζονται άμεσα με την αποτελεσματικότητα των ψεκασμών στο πεδίο, αυτό δε συμβαίνει στην περίπτωση του δάκου και άλλων ειδών της οικογένειας Tephritidae, για τα οποία εφαρμόζονται κυρίως δολωματικοί ψεκασμοί. Οι βιοδοκιμές τοπικής εφαρμογής παρέχουν έναν δείκτη για το φαινότυπο της ανθεκτικότητας, ενώ οι



βιοδοκιμές μέσω τροφής μπορεί να είναι πιο σχετικές και συχνά αποκαλύπτουν υψηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας. Ωστόσο, οι δύο μέθοδοι, όπως έχει φανεί παρουσιάζουν υψηλή συσχέτιση μεταξύ τους (Kakani et al., 2010).

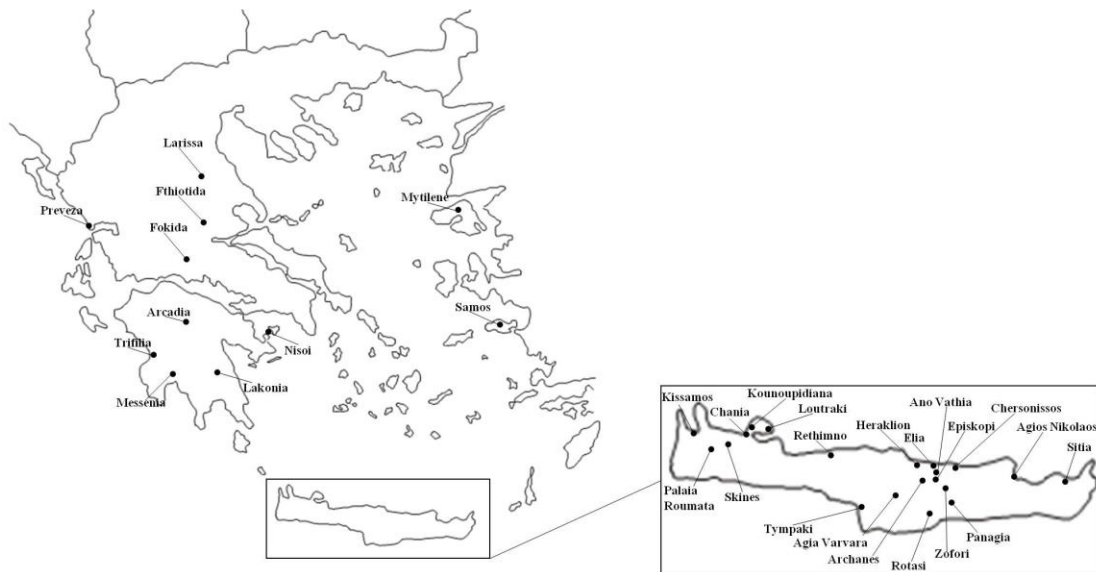
Ο πιο άμεσος τρόπος για να βρεθεί η επίδραση της ανθεκτικότητας, (εάν υπάρχει) στις εφαρμογές καταπολέμησης στο πεδίο (δηλ. η πρακτική ανθεκτικότητα, (Tabashnik et al., 2014), είναι με πειραματικές δοκιμές τοξικότητας στο πεδίο.

Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε παρακολούθηση της κατάστασης και εξέλιξης της ανθεκτικότητας σε πληθυσμούς δάκου από την Ελλάδα κατά τα έτη 2009 έως 2016, στα εντομοκτόνα alpha-cypermethrin, spinosad και dimethoate, εφαρμόζοντας εργαστηριακές δοκιμές τοξικότητας, βιοδοκιμές πεδίου και μοριακές διαγνωστικές δοκιμές.

## **2.2 Υλικά και μέθοδοι**

### **2.2.1 Πληθυσμοί δάκου (και ιστορικό των ψεκασμών τους)**

Κατά τη διάρκεια 9 ετών, 55 πληθυσμοί δάκου από διάφορες περιοχές της Ελλάδας (Εικόνα 2.1, Πίνακας 2.1) χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των επιπέδων ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα alpha-cypermethrin, spinosad, και dimethoate. Ως ευαίσθητος πληθυσμός αναφοράς χρησιμοποιήθηκε εργαστηριακός πληθυσμός (Lab), με αρχική προέλευση από την Κρήτη και εκτρέφεται σε εργαστηριακές συνθήκες, χωρίς έκθεση σε εντομοκτόνα για πάνω από 15 χρόνια.



**Εικόνα 2.1: Περιοχές συλλογής των πληθυσμών δάκου κατά τη διάρκεια της μελέτης (2009-2016)**

Για όλα τα δείγματα, συλλέχθηκε προσβεβλημένος ελαιόκαρπος από ελαιώνες, ο οποίος έμεινε σε πλαστικές λεκάνες σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας  $25 \pm 1$  °C και 16:8 ώρες φως:σκοτάδι. Οι λεκάνες περιείχαν αποστειρωμένο πριονίδι σαν υπόστρωμα για να λάβει χώρα η νύμφωση, ενώ οι νεοσηματισμένες νύμφες συλλέγονταν κάθε μέρα και μεταφέρονταν σε κλουβιά εκτροφής. Την ημέρα της εμφάνισης των ενηλίκων παρέχονταν στερεά τροφή (ζάχαρη: υδρολυμένη μαγιά, σε αναλογία 3:1 w/w) και νερό σε πλαστικό δοχείο που στο καπάκι του είχε ενσωματωμένο ένα τολύπιο βάμβακος (Margaritoroulos et al., 2008).

Στον Πίνακα 2.1 δίνεται το ιστορικό της εφαρμογής των εντομοκτόνων για κάθε πληθυσμό που συλλέχθηκε, όπου ήταν διαθέσιμο. Τα δεδομένα περιλαμβάνουν τις ομάδες των εντομοκτόνων που εφαρμόστηκαν τη χρονική περίοδο πριν την ημερομηνία συλλογής.

**Πίνακας 2.1: Πληροφορίες για τις περιοχές συλλογής των πληθυσμών *Bactrocera oleae* που συλλέχθηκαν και τις εφαρμογές εντομοκτόνων που πραγματοποιήθηκαν κατά την τρέχουσα καλλιεργητική περίοδο, τους μήνες πριν τη συλλογή τους.**

LAB	Location	Coordinates <sup>a</sup>	Sampling date	Application prior to collection		
				P <sup>b</sup>	O/C <sup>c</sup>	S <sup>d</sup>
CR_ANI09	Laboratory strain					
CR_ANI11	Crete, Lassithi, Agios Nikolaos	35.234628, 25.643902	08/2009	1		1
CR_ANI12			09/2011	1	1	1
CR_ANI13			11/2012	2	2	1
CR_ANI14			09/2013	NA	NA	NA
CR_ANI15			10/2014	2		2
CR_ANI16			11/2015	2		1
CR_SIT09	Crete, Lassithi, Siteia	35.195875, 26.094773	09/2016	2	1	1
CR_SIT11			08/2009	1		1
CR_SIT16			09/2011	2		1
CR_PRO09	Crete, Chania, Palea Roumata	35.404203, 23.780193	08/2009	2	2	
CR_SKI09	Crete, Chania, Skines	35.431460, 23.911770	08/2009			3
CR_KIS11	Creta, Chania, Kissamos	35.494409, 23.654462	09/2011			
CR_LOU12	Crete, Chania, Loutraki	35.505053, 24.167953	09/2011			
CR_CHA15	Crete, Chania	35.509603, 24.021877	11/2012	NA	NA	NA
CR_KOU16	Crete, Chania, Kounoupidiana,	35.533364, 24.076090	11/2016	1	1	3
CR_KOU17			10/2017			
CR_KIS16	Crete, Chania, Kissamos	35.494409, 23.654462	11/2016	2	1	2
CR_RET09	Crete, Rethimno	35.360068, 24.466487	09/2009	3		1
CR_AGV09	Crete, Heraklion, Agia Varvara	35.134602, 25.004895	10/2009	2	3	1
CR_HER11	Crete, Heraklion	35.137938, 24.998321				
CR_TIM15	Crete, Heraklion, Timpaki	35.086863, 24.767072	11/2015	NA	NA	NA
CR_AVA15	Crete, Heraklion, Ano Vathia	35.282633, 25.242898	10/2015	NA	NA	NA
CR_EPI16	Crete, Heraklion, Episkopi	35.260484, 25.233117				
CR_ZOF16	Crete, Heraklion, Zofori	35.207294, 25.268545				
CR_PAN16	Crete, Heraklion, Panagia	35.117882, 25.335733	11/2016	1	1	2
CR_ARC16	Crete, Heraklion, Archanes	35.241298, 25.169872				
CR_ROT16	Crete, Heraklion, Rotassi	35.010981, 25.175319				
CR_EL16	Crete, Heraklion, Elia	35.305236, 25.229844				
CR_AGV16	Crete, Heraklion, Agia Varvara	35.133051, 25.007752				
CR_CHE16	Crete, Heraklion, Chersonissos	35.300616, 25.368568				
NA_SAM09	North Aegean Sea, Samos	37.692752, 26.767030	10/2009	1		3
NA_SAM12			11/2012	2	1	1
NA_SAM15			10/2015	1	1	1
NA_SAM16-1	North Aegean Sea, Samos, Vathi, Chora, Pigos, Kastania, Karlovasi	37.706622, 26.969040 37.689494, 26.880974 37.707956, 26.802403 37.758513, 26.688528 37.787847, 26.713880	9/2016	2	1	1
NA_SAM16-2	North Aegean Sea, Samos, Vathi, Chora, Pigos, Kastania, Karlovasi	37.706622, 26.969040 37.689494, 26.880974 37.707956, 26.802403 37.758513, 26.688528 37.7878470, 26.713880	10/2016	2	1	2
NA_SAM16-3	North Aegean Sea, Samos, Kastania, Karlovasi	37.758513, 26.688528 37.7878470, 26.713880	11/2016	2	1	2
NA_SAM17	North Aegean Sea, Samos, Samion	37.765790, 26.970316		NA	NA	NA
NA_MIT09	North Aegean Sea, Mytilene	39.074382, 26.574761	08/2009			2
NA_MIT11			10/2011			4
NA_MIT12			11/2012			4
NA_MIT14			11/2014			5
NA_MIT16-1	North Aegean Sea, Mytilene, Central Mytilene	39.280822, 26.279801	10/2011			
NA_MIT16-2	North Aegean Sea, Mytilene, West Mytilene	39.209711, 26.023931	10/2011	2	1	2
NA_MIT16-3	North Aegean Sea, Mytilene, East Mytilene	39.033314, 26.453282	10/2011	2	2	2
SE_FOK09	Stereia Ellada, Fokida	38.455270, 22.437875	11/2009	2		
SE_FOK16			12/2016	2	1	
SE_FTH16	Stereia Ellada, Fthiotida, Ai Thanassis	39.100901, 22.265177	11/2016	3	2	
TH_LAR16	Thessalia, Larissa	39.915229, 22.590156	11/2016	3	2	1
PE_MES16	Peloponnisos, Messenia, Mikri Mantinia	36.985621, 22.153453	10/2016		3	3
PE_ARC16	Peloponnisos, Arcadia	37.415145, 22.709701	10/2016	1	1	
PE_LAK16	Peloponnisos, Lakonia	37.175743, 22.311470	10/2016	1	1	
PE_TRI16	Peloponnisos, Trifilia	37.185083, 21.619575	10/2016	2	1	1
AT_NIS16-1	Attiki, Nison, Dariza	37.495488, 23.365134	11/2016	2	1	1
AT_NIS16-2	Attiki, Nison, Tselevinia	37.438344, 23.537704	11/2016	2	1	1
EP_PRE16	Epirus, Preveza	39.134723, 20.629143	10/2016	2	1	

<sup>a</sup> Συντεταγμένες σε δεκαδικές μοίρες στο γεωδαιτικό σύστημα wgs84

<sup>b</sup> P: Πυρεθροειδή (alpha-cypermethrin, deltamethrin, lambda-cyhalothrin, and beta-cyfluthrin)

<sup>c</sup> O/C: Οργανοφωσφορικά/Καρβαμιδικά (dimethoate)

<sup>d</sup> S: Σπινουσίνες (spinosad)

## 2.2.2 Εργαστηριακές βιοδοκιμές τοξικότητας τοπικής εφαρμογής

Ενήλικα άτομα δάκου, ηλικίας 3-7 ημερών, χρησιμοποιήθηκαν σε βιοδοκιμές τοξικότητας με το πυρεθροειδές εντομοκτόνο alpha-cypermethrin (Tagros Chemicals India Ltd, Chennai, India) και τη σπινουσίνη spinosad (Dow Agrosiences LLC, Indianapolis, Indiana, USA). Οι βιοδοκιμές πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο της τοπικής εφαρμογής, η οποία όπως έχει δειχθεί, παρουσιάζει υψηλή συσχέτιση με τις βιοδοκιμές μέσω τροφής (Kakani et al., 2010). Οι δόσεις εντομοκτόνου ετοιμάστηκαν διαλύοντας το εντομοκτόνο σε ακετόνη. Στη συνέχεια, 1 ul από το διάλυμα εντομοκτόνου εφαρμόστηκε στη νωτιαία πλευρά του θώρακα κάθε ενήλικου ατόμου δάκου, με μικροσύριγγα Hamilton όγκου 10 ul.

Πριν από την εφαρμογή του εντομοκτόνου, τα έντομα εκτέθηκαν σε διοξείδιο του άνθρακα για ~12-15 sec ώστε να αναισθητοποιηθούν. Στην περίπτωση της βιοδοκιμής τοξικότητας εύρους δόσεων, 20-25 ενήλικα άτομα χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε δόση, ενώ εφαρμόστηκαν 5-7 δόσεις, συμπεριλαμβανομένου του μάρτυρα (καθαρή ακετόνη). Στην περίπτωση της βιοδοκιμής διαγνωστικής δόσης, η συγκέντρωση του εντομοκτόνου που εφαρμόστηκε ήταν η διπλάσια αυτής που σκοτώνει το 99% του ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού αναφοράς. Σε κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκε περίπου ίσος αριθμός θηλυκών και αρσενικών ατόμων.

Μετά την εφαρμογή του εντομοκτόνου, τα ενήλικα άτομα τοποθετήθηκαν σε κλουβιά βιοδοκιμών με σταθερή παροχή νερού και τροφής και σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας και φωτοπεριόδου. Η θνησιμότητα μετρήθηκε 48 ώρες μετά από την εφαρμογή του εντομοκτόνου, δεδομένου ότι και τα δύο εντομοκτόνα που δοκιμάστηκαν είναι ταχείας δράσης (Hunter White et al., 2007; Leong et al., 2020; WHO, 2016). Η ανάλυση probit (Finney, 1971) των αποτελεσμάτων έγινε με το PoloPC (LeOra Software, Berkeley, CA, USA), για τον υπολογισμό της μέσης θανατηφόρας δόσης (LC50, lethal concentration-50). Ο συντελεστής ανθεκτικότητας (RF, resistant factor) υπολογίστηκε με βάση τις LC50 τιμές ως  $RF = LC50 \text{ άγριου πληθυσμού} / LC50 \text{ ευαίσθητου πληθυσμού αναφοράς}$ . Τα επίπεδα ανθεκτικότητας καθορίστηκαν βάσει των κριτηρίων των Torres-Vila et al. (2002a, b): ευαίσθησία: (RF = 1), χαμηλή ανθεκτικότητα (RF = 2–10), μέτρια ανθεκτικότητα (RF = 11–30), υψηλή ανθεκτικότητα (RF = 31–100) και πολύ υψηλή ανθεκτικότητα (RF = > 100). Τα αποτελέσματα από τις βιοδοκιμές τοξικότητας εκφράζονται σε μιλιγραμμάρια δραστικής ουσίας ανά λίτρο διαλύματος εντομοκτόνου ( $mg L^{-1}$ , milligrams per litre).

Περίπου 30 ενήλικα άτομα από κάθε πληθυσμό αποθηκεύτηκαν στους -20 °C ώστε να διεξαχθούν στη συνέχεια οι μοριακές αναλύσεις.

### **2.2.3 Βιοδοκιμές σε κλουβιά στον ελαιώνα**

Οι βιοδοκιμές τοξικότητας του πεδίου διεξάχθηκαν σε ένα μικρό βιολογικό ελαιώνα (0,25 εκτάρια), στο χωριό Κλήμα (35.108803, 24.761313), στη νότια Κρήτη. Ο ελαιώνας αποτελείται από ελαιοπονήσιμες ελιές της ποικιλίας Κορωνέικη, ηλικίας περίπου 20 ετών, οι οποίες δέχονται συστηματική καλλιεργητική φροντίδα τα τελευταία 10 χρόνια.

Έξι κλουβιά (12 m<sup>3</sup> το καθένα) χρησιμοποιήθηκαν (Εικόνα 2.2) για να καλύψουν εξ' ολοκλήρου 6 δέντρα (ύψους ~2,5 m), αμέσως μετά τη δημιουργία των καρπών. Όλα τα δέντρα που χρησιμοποιήθηκαν έμειναν καλυμμένα έως την πλήρη ανάπτυξη των καρπών, οπότε διεξάχθηκε ο ψεκασμός. Καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της περιόδου, υπήρχε τοποθετημένη μία παγίδα McPhail η οποία περιείχε ελκυστικό, το οποίο ανανεώνονταν όποτε ήταν απαραίτητο. Η τοποθέτηση των παγίδων έγινε ώστε να προσελκυστούν και να παγιδευτούν τα έντομα που εγκλωβίστηκαν κατά τη διάρκεια του εγκλεισμού του ελαιόδεντρου καθώς και για να εντοπιστεί ενδεχόμενη είσοδος εντόμων μέσα στο κλουβί. Οι παγίδες ελέγχονταν ανά εβδομάδα και για όσο έμειναν καλυμμένα, έως και πριν την έναρξη των πειραμάτων, στις παγίδες δεν εντοπίστηκαν άτομα δάκου.



**Εικόνα 2.2:** Πανοραμική, ενδεικτική φωτογραφία των καλυμμένων δέντρων (κλουβιών) που στήθηκαν για τις βιοδοκιμές στον ελαιώνα.

Οι δύο επαναλήψεις του πειράματος έγιναν σε διάστημα 15 ημερών, η πρώτη στις αρχές του Νοέμβρη και η δεύτερη πριν τα μέσα του ίδιου μήνα. Πριν την πραγματοποίηση των πειραμάτων τα δέντρα ελέγχθηκαν για τυχόν προσβολή, η οποία βρέθηκε μηδενική σε όλα τα καλυμμένα δέντρα. Το εντομοκτόνο alpha-cypermethrin εφαρμόστηκε στη συνιστώμενη δόση του σκευάσματος, ως δολωματικός ψεκασμός σε κάθε υπό-δοκιμή δέντρο. Σε κάθε δέντρο εφαρμόστηκαν 0,3 L υδατικού διαλύματος που περιείχαν 300 mg L<sup>-1</sup> εντομοκτόνου και 20 g L<sup>-1</sup> ελκυστικού. Χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό σκεύασμα Fastac 10 SC (alpha-cypermethrin 10% w/v, BASF Hellas, Athens, Greece) και το ελκυστικό Entomela 75 SL (urea 25% w/w and protein hydrolysates 75% w/w, BASF Hellas, Athens, Greece). Τα δέντρα που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες ψεκάστηκαν μόνο με ελκυστικό δόλωμα. Ο ψεκασμός πραγματοποιήθηκε με ψεκαστήρα προτιέσεως με ρυθμιζόμενο ακροφύσιο, όγκου 5 L.

Η συλλογή και συντήρηση των εντόμων έως ότου χρησιμοποιηθούν έγινε όπως περιγράφεται στο Κεφ. 2.2.1, Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικοί πληθυσμοί, οι οποίοι επιλέχθηκαν βάσει της ανταπόκρισής τους στη δραστική alpha-cypermethrin. Οι πληθυσμοί αυτοί είχαν ελεγχθεί το προηγούμενο έτος και παρουσίαζαν



διαφορετικά επίπεδα ανθεκτικότητας στο alpha-cypermethrin, όποτε επιλέχθηκαν ώστε να διαπιστωθεί εάν αυτή η διαφορά αντικατοπτρίζεται και στην ανταπόκρισή τους σε ψεκάσμο στο πεδίο. Οι πληθυσμοί συλλέχθηκαν από την περιοχή των Κουνουπιδιανών (CR\_KOU17, Πίνακας 2.2), στα Χανιά της Κρήτης και από την περιοχή των Σαμίων της Σάμου (NA\_SAM17, Πίνακας 2.2) στο Βόρειο Αιγαίο. Ενήλικα άτομα από κάθε πληθυσμό, αρχικά υποβλήθηκαν σε βιοδοκιμές τοξικότητας εύρους δόσεων, με τη μέθοδο της τοπικής εφαρμογής (περιγράφεται στο Κεφ. 2.2.2) ώστε να υπολογιστούν τα επίπεδα ανθεκτικότητας για κάθε πληθυσμό.

Σε κάθε καλυμμένο δέντρο, δύο ημέρες μετά τη διενέργεια του ψεκασμού, απελευθερώθηκαν περίπου 80-100 ενήλικα έντομα, ίσος αριθμός θηλυκών και αρσενικών ατόμων. Σε κάθε επανάληψη, ο κάθε πληθυσμός απελευθερώθηκε, σε ένα δέντρο που είχε ψεκαστεί δολωματικά με εντομοκτόνο. Στην πρώτη επανάληψη άτομα από τον πληθυσμό Samos απελευθερώθηκαν στο δέντρο μάρτυρα, ενώ στη δεύτερη επανάληψη χρησιμοποιήθηκαν άτομα από τον πληθυσμό Kounouridiana.

Τα νεκρά άτομα καταγράφονταν σε κάθε δέντρο κάθε 24 ώρες μετά την απελευθέρωση των ατόμων, για 4 ημέρες. Σεντόνια λευκού χρώματος απλώθηκαν στην κάτω επιφάνεια του κλουβιού, ώστε να διευκολύνει την εύρεση των νεκρών εντόμων (Εικόνα 2.3).



**Εικόνα 2.3: Καλυμμένο δέντρο (κλουβί) στο οποίο πραγματοποιήθηκε βιοδοκιμή στον ελαιώνα.**

Η θερμοκρασία στο εσωτερικό των κλουβιών καταγράφηκε με αισθητήρες HOBO (Onset Computer Corporation, Bourne, MA, USA) κατά τη διάρκεια των 4 ημερών του πειράματος.

## **2.2.4 Απομόνωση γενωματικού DNA και εφαρμογή μοριακών διαγνωστικών μεθόδων**

Η απομόνωση του γενωματικού DNA πραγματοποιήθηκε με το πρωτόκολλο DNAzol, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Invitrogen). Κάθε δείγμα γενωματικού DNA προέρχονταν από ένα θηλυκό ή αρσενικό ενήλικο άτομο δάκου.

Μετά την εξαγωγή του, το ολικό DNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα σε PCR-RFLP αντιδράσεις, για την ανίχνευση των σημειακών μεταλλαγών ανθεκτικότητας G488S και I214V στο γονίδιο boAChE του δάκου, όπως έχουν περιγραφεί από τους Margaritoroulos et al. (2008) και Hawkes et al. (2005), αντίστοιχα. Εν συντομία, για την ανίχνευση της G488S μεταλλαγής, ενισχύεται ένα τμήμα μεγέθους 100 bp με τους εκκινητές D6F και D6R (Πίνακας 2.1) και το προϊόν χρησιμοποιείται σε αντίδραση



πέψης με το ένζυμο περιορισμού M<sub>bol</sub>. Μετά την πέψη, τα προϊόντα που προκύπτουν για το ευαίσθητο αλληλόμορφο είναι ένα προϊόν μεγέθους 100 bp, ενώ για το ανθεκτικό αλληλόμορφο προκύπτουν δύο προϊόντα μεγέθους 31 και 69 bp. Η ανάλυση των προϊόντων μετά την πέψη περιορισμού έγινε σε πηκτή αγαρόζης περιεκτικότητας 3,5%. Αντίστοιχα, για την ανίχνευση της I214V μεταλλαγής, ενισχύεται ένα τμήμα μεγέθους 232 bp με τους Boace3F και Boace3R εκκινητές (Πίνακας 2.2) και το προϊόν χρησιμοποιείται στη συνέχεια σε αντίδραση πέψης με το περιοριστικό ένζυμο AclI. Από την πέψη προκύπτει ένα προϊόν 232 bp στην περίπτωση του ευαίσθητου αλληλόμορφου και δύο προϊόντα μεγέθους 64 και 168 bp στην περίπτωση του ανθεκτικού αλληλόμορφου. Η ανάλυση των προϊόντων μετά την πέψη περιορισμού έγινε σε πηκτή αγαρόζης περιεκτικότητας 2%. Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε η Kapa Taq DNA polymerase (Kapa Biosystems, Inc.), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι συνθήκες των αντιδράσεων δίνονται στον Πίνακα 2.2,

Για την ανίχνευση της Δ3Q έλλειψης, πραγματοποιήθηκε μία allele-specific PCR αντίδραση, όπως έχει περιγραφεί από τους (Kakani et al., 2014). Συνοπτικά, δύο αντιδράσεις διεξάγονται, στην πρώτη ενισχύεται ένα τμήμα μεγέθους 76 bp με τους εκκινητές Ex10wt3\_F-IMP και Boace10R (Πίνακας 2.2) όταν υπάρχει το αλληλόμορφο αγρίου τύπου, ενώ στη δεύτερη ενισχύεται ένα τμήμα μεγέθους 67 bp με τους εκκινητές Ex10mut3\_F-IMP και Boace10R (Πίνακας 2.2) όταν υπάρχει το ανθεκτικό αλληλόμορφο. Τα προϊόντα αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης περιεκτικότητας 1,5%.

**Πίνακας 2.2: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και οι συνθήκες της PCR αντίδρασης που εφαρμόστηκαν για την ανίχνευση των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, G488S, I214V και Δ3Q.**

Εκκινητής (5' → 3')	Συνθήκες PCR αντίδρασης
D6F (TATTATACACACCAGCTGGGTTGGTAATCCG)	95 °C for 5 min, 30 cycles of [94 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, 72 °C for 30 s], 72 °C 10 min
D6R (ATATTTATAAGGGCAGGTGAAGAAITGACCGC)	
Boace3F (GCTTACCCGTGCTTATTTGG)	95 °C for 5 min, 30 cycles of [94 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, 72 °C for 30 s], 72 °C 10 min
Boace3R (AGCCAACGTATAGCCAATGC)	
Ex10wt3_F-IMP (CTTCCTCCCTGCAACAATAG)	94 °C for 4 min, 30 cycles of [94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 30 s], 72 °C 10 min
Ex10mut3_F-IMP (CTTCCTCCCTGCAACAATAC)	
Boace10R (GACAGCGCCAACATGAACG)	

## 2.3 Αποτελέσματα

### 2.3.1 Ιστορικό εφαρμογής ψεκασμών στους πληθυσμούς που ελέγχθηκαν

Στον Πίνακα 2.1 παρουσιάζονται οι ομάδες εντομοκτόνων με τα οποία έγιναν ψεκασμοί πριν τη συλλογή του προσβεβλημένου ελαιόκαρπου από κάθε περιοχή. Οι πληροφορίες αφορούν 40 πληθυσμούς, συμπεριλαμβανομένων και 5 στους οποίους δεν έγινε κάποια εφαρμογή. Για τους λοιπούς 15 πληθυσμούς δεν ήταν διαθέσιμα τα δεδομένα των ψεκασμών.

Τα εντομοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν περισσότερο ήταν τα πυρεθροειδή και οι σπινουσίνες, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν τουλάχιστον μία φορά στο 83,7 και 78,4% των περιπτώσεων, αντίστοιχα. Επίσης, τα οργανοφωσφορικά χρησιμοποιήθηκαν αρκετά, αλλά σε μικρότερο ποσοστό, περίπου στο 70% των περιπτώσεων.

### 2.3.2 Η κατάσταση και η τελευταία εξέλιξη της ανθεκτικότητας του δάκου στα εντομοκτόνα alpha-cypermethrin και spinosad

Τα αποτελέσματα από τις βιοδοκιμές τοξικότητας εύρους δόσεων, με το εντομοκτόνο alpha-cypermethrin παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.3 Α. Παρατηρήθηκε μία διακύμανση στις LC<sub>50</sub> τιμές μεταξύ των πληθυσμών από 0,55 mg L<sup>-1</sup> το 2009 έως 53,92 mg L<sup>-1</sup> το 2016. Οι συντελεστές ανθεκτικότητας (RFs) ήταν σχετικά χαμηλοί έως μέτριοι το 2009 (RF = 4–29), όμως, το 2016 και 2017, είχαν αυξηθεί δραματικά. Πιο συγκεκριμένα, 1 από τους 21 πληθυσμούς χαρακτηρίστηκε ως μέτρια ανθεκτικός (RF < 30), 7 ως υψηλά ανθεκτικοί (RF μεταξύ 36 και 85) και 13 πληθυσμοί ως πολύ υψηλά ανθεκτικοί (RF μεταξύ 110 και 359). Ο πιο ανθεκτικός πληθυσμός συλλέχθηκε από τα Κουνουπιδιανά στα Χανιά της Κρήτης (Εικόνα 2.1).

Η σύγκριση των LC<sub>50</sub> τιμών σε σχέση με τη γεωγραφική προέλευση των πληθυσμών έδειξε ότι εκείνοι που συλλέχθηκαν από την Κρήτη (μέση LC<sub>50</sub> 21,96)

εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας σε σχέση με εκείνους που συλλέχθηκαν από άλλες περιοχές της Ελλάδας (μέση LC50 11,30, ANOVA,  $F = 5,25$ ,  $P < 0,04$ ).

**Πίνακας 2.3: Αποτελέσματα βιοδοκιμών τοξικότητας (A) εύρους δόσεων και (B) διαγνωστικών δόσεων, άγριων πληθυσμών δάκου, *Bactrocera oleae*, και του ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού (LAB), στο alpha-cypermethrin.**

<b>A. ΒΙΟΔΟΚΙΜΗ ΕΥΡΟΥΣ ΔΟΣΕΩΝ</b>									
<b>ΕΤΟΣ</b>	<b>Πληθυσμός</b>	<b>N<sup>a</sup></b>	<b>LC<sub>50</sub> [mg L<sup>-1</sup>]</b>	<b>FL95%<sup>b</sup></b>	<b>Slop e</b>	<b>s.e.</b>	<b>Χ<sup>2</sup></b>	<b>df</b>	<b>RR<sup>c</sup></b>
	LAB	118	0,15	0,05-0,66	1,55	0,23	27,8	8	1
<b>2009</b>	CR_ANI09	103	2,60	1,60-4,30	1,80	0,36	4,7	2	17
	CR_SIT09	101	4,40	2,10-6,70	2,20	0,58	0,5	1	29
	CR_PRO09	116	3,60	1,50-8,60	2,10	0,92	8,7	2	24
	CR_SKI09	112	2,20	1,50-3,40	2,00	0,36	2,3	2	15
	CR_AGV09	95	1,40	0,92-2,20	2,10	0,41	0,3	1	9
	NA_SAM09	92	0,76	0,44-1,20	2,10	0,44	5,5	2	5
	NA_MIT09	93	1,50	0,77-2,30	2,30	0,63	1,2	1	10
	SE_FOK09	36	0,55	0,05-1,10	2,00	0,87	1,9	2	4
<b>2016</b>	CR_ANI16	99	16,66	9,15-29,94	2,41	0,38	13,7	8	111
	CR_SIT16	121	22,76	5,86-43,09	1,43	0,31	19,4	10	152
	CR_EPI16	83	16,52	3,25-30,11	2,15	0,49	8,5	6	110
	CR_ZOF16	100	7,65	5,40-10,49	3,01	0,56	1,4	8	51
	CR_PAN16	87	20,65	14,81-28,78	2,73	0,47	4,8	6	138
	CR_ARC16	107	23,72	5,09-48,92	2,15	0,49	13,0	8	158
	CR_ROT16	80	19,51	13,07-28,71	2,44	0,45	3,2	6	130
	CR_ELI16	103	17,12	11,48-22,41	3,13	0,75	5,1	8	114
	CR_AGV16	79	21,77	17,14-27,92	3,57	0,75	5,3	6	145
	CR_CHE16	87	22,11	12,78-36,08	2,69	0,52	9,6	6	147
	CR_KOU16	87	53,92	31,87-75,61	3,71	1,07	5,5	7	359
	PE_MES16	101	19,5	11,68-28,23	1,47	0,48	6,4	8	130
	AT_NIS16-1	84	18,58	13,02-25,93	2,91	0,77	5,3	6	124
	AT_NIS16-2	93	8,36	5,61-11,29	2,98	0,61	6,3	7	56
	EP_PRE16-1	94	3,7	1,44-7,35	1,29	0,25	8,2	7	25
	NA_SAM16-1	60	5,82	2,16-9,88	1,78	0,46	1,9	3	39
	NA_MIT16-1	112	12,75	6,80-19,35	1,87	0,93	4,6	9	85
	SE_FTH16	91	10,37	6,82-14,24	2,19	0,45	3,9	6	69
SE_FOK16	93	11,36	4,51-23,63	2,02	0,34	12,3	6	76	
<b>2017</b>	CR_KOU17	120	49,7	28,5-86,8	2,03	0,35	10,4	8	331
	NA_SAM17	113	5,4	2,9-9,9	1,63	0,29	7,7	7	36

<b>B. ΒΙΟΔΟΚΙΜΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗΣ ΔΟΣΗΣ</b>			
	<b>Πληθυσμός</b>	<b>N</b>	<b>Θνησιμότητα (%)</b>
<b>2011</b>	LAB	30	100
	CR_ANI11	40	95±7,1
	CR_SIT11	30	90±4,7
	CR_KIS11	39	98,5±1,5
	NA_MIT11	15	100
	CR_HER11	20	100
<b>2012</b>	CR_LOU12	20	100
	NA_SAM12	21	100
	NA_MIT12	12	100
<b>2013</b>	CR_ANI13	12	33,3
<b>2014</b>	NA_MIT14	10	20
	CR_ANI15	11	36,4
<b>2015</b>	CR_CHA15	10	0
	CR_TIM15	10	0
	NA_SAM15	37	48,3±25,2
<b>2016</b>	PE_ARC16	37	6,1±10,5
	PE_LAK16	20	0
	TH_LAR16	33	32,5±30,3
	CR_KIS16	21	10±14,1
	NA_MIT16-2	53	24,9±7,3
	NA_MIT16-3	30	14,1±5,8
	AT_NIS16-2	33	29,2±19,2
	EP_PRE16	20	25,8±10,7
	NA_SAM16-2	67	46,7±8
	PE_TRI16	33	11,1±12,7

Η διαγνωστική δόση του alpha-cypermethrin ήταν στα 3,6 mg L<sup>-1</sup>. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ανά έτος και πληθυσμό.

<sup>a</sup> N: αριθμός ατόμων που ελέγχθηκαν, δεν περιλαμβάνονται οι μάρτυρες

<sup>b</sup> FL: διαστήματα εμπιστοσύνης (fiducial limits)

<sup>c</sup> RF: συντελεστής ανθεκτικότητας (resistant factor)

Τα αποτελέσματα από τους 25 πληθυσμούς στους οποίους εφαρμόστηκε διαγνωστική δόση με το εντομοκτόνο alpha-cypermethrin (Πίνακας 2.3 Β), έδειξαν μία αξιόλογη μείωση των ποσοστών θνησιμότητας κατά τη διάρκεια των ετών 2013–2016 (μέση θνησιμότητα 21,15%), συγκριτικά με τη χρονική περίοδο 2011–2012 (μέση θνησιμότητα 97,94%, ANOVA,  $F = 175,7$ ,  $P < 0,001$ ).

Χαμηλά επίπεδα ανθεκτικότητας καταγράφηκαν σε όλους τους πληθυσμούς που ελέγχθηκαν για το εντομοκτόνο spinosad (Εικόνα 2.4). Τα ποσοστά θνησιμότητας κυμάνθηκαν από 84,6% έως και 100% κατά τη διάρκεια των ετών 2011-2016. Κάποιοι πληθυσμοί από το βόρειο Αιγαίο, έδειξαν πιο συστηματικά χαμηλότερη θνησιμότητα σε σχέση με τους υπόλοιπους πληθυσμούς που ελέγχθηκαν.



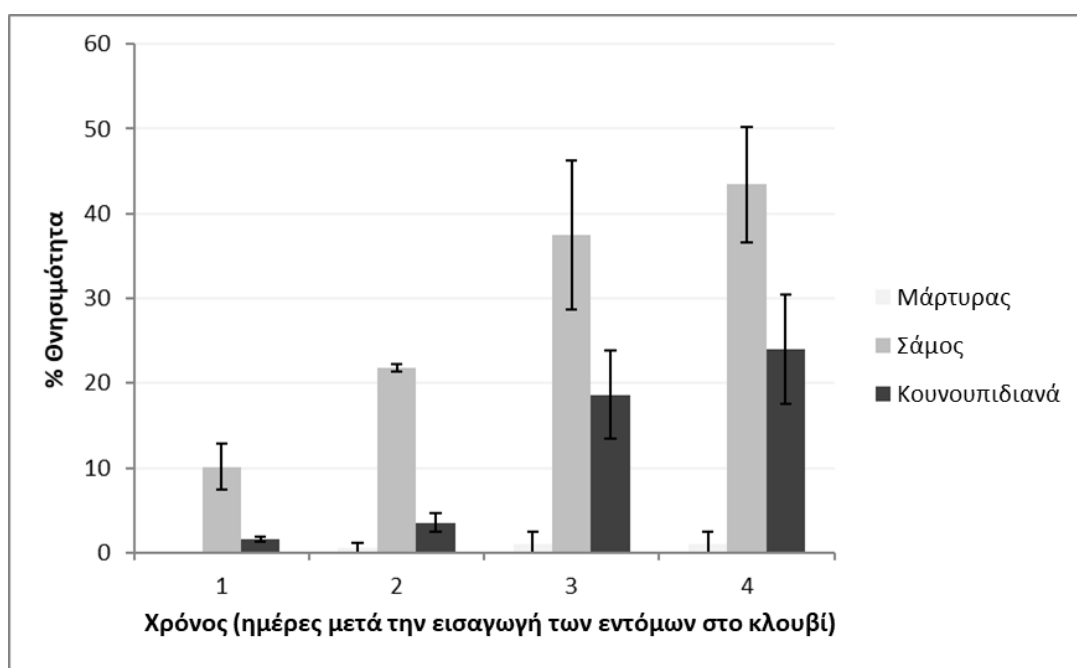
**Εικόνα 2.4:** Ποσοστιαία θνησιμότητα άγριων πληθυσμών δάκου οι οποίοι εκτέθηκαν σε διαγνωστική δόση ( $62 \text{ mg L}^{-1}$ ) του εντομοκτόνου spinosad. Οι βιοδοκιμές πραγματοποιήθηκαν κατά τα έτη 2011 και 2016. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλματος μέσης τιμής των διαφορετικών επαναλήψεων.

### 2.3.2 Επίδραση της ανθεκτικότητας στο alpha-cypermethrin στην αποτελεσματικότητα της εφαρμογής του στο πεδίο

Οι δάκοι που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμές τοξικότητας στο πεδίο προέρχονταν από προσβεβλημένο ελαιόκαρπο που συλλέχθηκε από το τοπικό διαμέρισμα Σαμίων της Σάμου, στο Βόρειο Αιγαίο (NA\_SAM17) και από τα Κουνουπιδιανά του νομού Χανίων στην Κρήτη (CR\_KOU17). Οι δύο πληθυσμοί είχαν αρκετά διαφορετική ανταπόκριση στη δραστική ουσία alpha-cypermethrin, όταν ελέγχθηκαν με βιοδοκιμές τοπικής εφαρμογής (Πίνακας 2.3 A) (NA\_SAM17:  $5,4 \text{ mg L}^{-1}$  and CR\_KOU17:  $49,7 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Η θερμοκρασία στο εσωτερικό των κλουβιών στο πεδίο κατά τη διάρκεια της πρώτης επανάληψης του πειράματος κυμάνθηκε μεταξύ 12,2 και 31,1 °C, και κατά τη διάρκεια της δεύτερης επανάληψης μεταξύ 7,4 και 30,3 °C. Η μέση θερμοκρασία μέσα στα κλουβιά ήταν  $18,9 \pm 0,23$  °C και  $16,8 \pm 0,09$  °C κατά την πρώτη και δεύτερη επανάληψη, αντίστοιχα. Δε σημειώθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στη θερμοκρασία που καταγράφηκε μεταξύ των κλουβιών σε κάθε επανάληψη (1<sup>η</sup> επανάληψη:  $F = 0,153$ ,  $P = 0,86$ , 2<sup>η</sup> επανάληψη:  $F = 0,06$ ,  $P = 0,82$ ).

Μετά την απελευθέρωση των εντόμων, η μέση θνησιμότητα, μεταξύ των δύο επαναλήψεων, ήταν για τον πληθυσμό της Σάμου 10,1 , 21,8 , 37,5 και 43,4% για την 1<sup>η</sup>, 2<sup>η</sup>, 3<sup>η</sup> και 4<sup>η</sup> ημέρα, ενώ οι αντίστοιχες τιμές για τον πληθυσμό από τα Κουνουπιδιανά ήταν 1,6 , 3,5 , 18,6 και 24,0% (Εικόνα 2.5). Η μέση θνησιμότητα στο μάρτυρα ήταν 1%.



**Εικόνα 2.5:** Μέση ποσοστιαία θνησιμότητα των δειγμάτων *Bactrocera oleae* που εκτέθηκαν στο alpha-cypermethrin σε βιοδοκιμές στον ελαιώνα. Η μέση θνησιμότητα παρουσιάζεται 1-4 ημέρες μετά την έκθεση στο εντομοκτόνο. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής των διαφορετικών επαναλήψεων.

### 2.3.3 Ανίχνευση των μεταλλαγών ανθεκτικότητας του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης, σε πληθυσμούς πεδίου

26 δείγματα από την Ελλάδα αναλύθηκαν για την παρουσία των G488S και I214V μεταλλαγών ανθεκτικότητας, όπως και της Δ3Q έλλειψης στο γονίδιο boACHE του δάκου (Πίνακας 2.4). Οι αναλύσεις έδειξαν ότι 9 από τους 26 πληθυσμούς ήταν ομοζυγωτοί για τις σημειακές μεταλλαγές G488S και I214V. Στα περισσότερα δείγματα, (23 από τα 26), τα αγρίου τύπου αλληλόμορφα ανιχνεύτηκαν μόνο σε ετεροζυγωτή κατάσταση και σε αρκετά χαμηλές συχνότητες. Αγρίου τύπου ομοζυγωτά άτομα εντοπίστηκαν μόνο σε 3 πληθυσμούς οι οποίοι είχαν συλλεχθεί από τη Σάμο και τη Μυτιλήνη. Όπως διαφαίνεται, οι μεταλλαγές ανθεκτικότητας στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, G488S και I214V έχουν εγκατασταθεί σε όλους τους πληθυσμούς που ελέγχθηκαν, εκτός από αυτούς από τα νησιά του Βορείου Αιγαίου.

Η Δ3Q έλλειψη βρέθηκε σε 13 από τους 26 πληθυσμούς που ελέγχθηκαν, σε σχετικά χαμηλά ποσοστά (από 2,5 έως 12,5%), ενώ δεν εντοπίστηκε κανένα ομοζυγωτό για τη μεταλλαγή άτομο.

Η μέση ποσοστιαία συχνότητα για όλους τους πληθυσμούς που ελέγχθηκαν για τις μεταλλαγές G488S και I214V και Δ3Q ήταν το 2009, 88,2 , 89,9 και 3,1%, αντίστοιχα, ενώ το 2016 οι αντίστοιχες τιμές ήταν 94,9 , 95,5 , and 2,3%. Στην περίπτωση των μεταλλαγών G488S και I214V υπήρξε μία σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών των συχνοτήτων των ετών 2009 και 2016 (G488S:  $F = 6,89$ ,  $P < 0,02$  & I214V:  $F = 5,72$ ,  $P < 0,03$ ). Για την έλλειψη Δ3Q δεν υπήρξε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στις συχνότητες, για τα δύο αυτά έτη ( $F = 1,83$ ,  $P > 0,1$ ).

**Πίνακας 2.4: Παρουσία των αλληλομόρφων ανθεκτικότητας στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα σε δείγματα άγριων πληθυσμών δάκου, *Bactrocera oleae***

Έτος	Πληθυσμός	Μέγεθος δείγματος (αλληλόμορφα)	Αλληλική συχνότητα μεταλλαγής ανθεκτικότητας (ετερόζυγωτή/ομοζυγωτή)		
			%Gly488Ser	%Ile214Val	%Δ3Q
	Lab	16	0 (0/0)	0 (0/0)	0 (0/0)
<b>2009</b>	CR_ANI09	16	88 (2/12)	88 (2/12)	0 (0/0)
	CR_SIT09	16	88 (2/12)	94 (1/14)	0 (0/0)
	CR_PRO09	16	88 (2/12)	88 (2/12)	0 (0/0)
	CR_AGV09	16	94 (1/14)	94 (1/14)	6,2 (1/0)
	CR_RET09	16	88 (2/12)	88 (2/12)	12,5 (2/0)
	NA_SAM09	16	75 (2/10)	81 (1/12)	0 (0/0)
	NA_MIT09	16	69 (1/10)	75 (2/10)	6,2 (1/0)
<b>2016</b>	SE_FOK09	16	100 (0/16)	100 (0/16)	6,2 (1/0)
	CR_ANI16	36	91,7 (3/30)	91,7 (3/30)	0 (0/0)
	CR_SIT16	24	100 (0/24)	100 (0/24)	0 (0/0)
	CR_ROT16	16	93,8 (1/14)	93,8 (1/14)	0 (0/0)
	CR_ELI16	16	100 (0/16)	100 (0/16)	6,2 (1/0)
	CR_EPI16	14	100 (0/14)	100 (0/14)	7,1 (1/0)
	CR_PAN16	28	96,4 (1/26)	96,4 (1/26)	0 (0/0)
	CR_ZOF16	24	100 (0/24)	100 (0/24)	4,2 (1/0)
	CR_CHE16	20	100 (0/20)	100 (0/20)	5 (1/0)
	NA_SAM16-3	40	72,5 (7/22)	75 (6/24)	0 (0/0)
	NA_MIT16	36	86,1 (5/26)	86,1 (5/26)	2,8 (1/0)
	PE_LAK16	40	100 (0/40)	100 (0/40)	0 (0/0)
	TH_LAR16	36	97,2 (1/34)	97,2 (1/34)	2,8 (1/0)
	AT_NIS16	36	94,4 (2/32)	97,2 (1/34)	0 (0/0)
	EP_PRE16	36	91,7 (3/30)	91,7 (3/30)	2,8 (1/0)
PE_MES16	40	100 (0/40)	100 (0/40)	0 (0/0)	
SE_FTH16	30	93,3 (2/26)	93,3 (2/26)	3,3 (1/0)	
SE_FOK16	36	94,4 (2/32)	97,2 (1/34)	0 (0/0)	
PE_TRI16	40	100 (0/40)	100 (0/40)	2,5 (1/0)	

## 2.4 Συζήτηση

Μία εντυπωσιακή αύξηση της ανθεκτικότητας στο εντομοκτόνο alpha-cypermethrin παρατηρήθηκε μετά το 2013 στους πληθυσμούς από περιοχές της Ελλάδας, ιδιαίτερα



στην περιοχή της Κρήτης, όπου η συγκεκριμένη δραστική ουσία χρησιμοποιείται ευρέως τα τελευταία χρόνια σε δολωματικούς ή ψεκασμούς κάλυψης. Στο παρελθόν, έχει σημειωθεί ξανά, κατά τα έτη 2003-2006 παρουσία ανθεκτικότητας στο alpha-cypermethrin (LC50 τιμές έως 3,28 mg L<sup>-1</sup>) (Margaritoroulos et al., 2008). Παρ' όλα αυτά, στην παρούσα μελέτη, είναι η πρώτη φορά που καταγράφονται τόσο υψηλές τιμές LC50 (έως 53,92 mg L<sup>-1</sup>).

Μένει να ξεκαθαριστεί ο μηχανισμός στον οποίο οφείλεται ο φαινότυπος της ανθεκτικότητας, καθώς επίσης το εύρος της διασταυρωτής ανθεκτικότητας σε άλλες δραστικές ουσίες, όπως πυρεθροειδή που έχουν εισαχθεί πιο πρόσφατα στη διαθέσιμη λίστα εντομοκτόνων για την καταπολέμηση του δάκου, όπως είναι το lambda-cyhalothrin και το beta-cyfluthrin. Αξίζει να σημειωθεί, ότι προκαταρκτικά πειράματα δοκιμών τοξικότητας έχουν δείξει χαμηλότερη ευαισθησία στο lambda-cyhalothrin. Πιο συγκεκριμένα, το ποσοστό θνησιμότητας του πληθυσμού CR\_KOU17 ήταν 30%, σε σύγκριση με την 100% θνησιμότητα του ευαίσθητου εργαστηριακού πληθυσμού Lab, στη διαγνωστική δόση των 9 mg L<sup>-1</sup> lambda-cyhalothrin.

Η ανθεκτικότητα πεδίου που έχει εμφανιστεί φαίνεται να έχει έναν ξεκάθαρο αντίκτυπο στην αποτελεσματικότητα των εφαρμογών καταπολέμησης του δάκου (πρακτική ανθεκτικότητα). Στα πειράματα πραγματικών συνθηκών αγρού, η θνησιμότητα του ανθεκτικού στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα πληθυσμού από τα Κουνουπιδιανά (LC50 49,7 mg L<sup>-1</sup>) ήταν ευκρινώς χαμηλότερη σε σύγκριση με αυτή του χαμηλότερης ανθεκτικότητας πληθυσμού από τη Σάμο (LC50 5,4 mg L<sup>-1</sup>): 1,6% σε αντίθεση με το 10,1% την 1<sup>η</sup> ημέρα, και 24% σε αντίθεση με το 43,4% την 4<sup>η</sup> ημέρα.

Τα ευρήματα αυτά, αποτελούν ξεκάθαρη ένδειξη ότι υπάρχει επίδραση της ανθεκτικότητας στην αποτελεσματικότητα των δολωματικών ψεκασμών στον ελαιώνα, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται από τους φορείς που εμπλέκονται στα προγράμματα καταπολέμησης του δάκου, παρά το γεγονός ότι το ακριβές ποσοστό αποτυχίας των επεμβάσεων και κατ' επέκταση η επακόλουθη ζημιά στις ελιές δεν μπορεί να προσδιοριστεί.

Σε αντίθεση με το alpha-cypermethrin, δεν υπήρξαν σοβαρές ενδείξεις για ανάπτυξη ανθεκτικότητας στη δραστική ουσία spinosad, σε όλους τους πληθυσμούς, εκτός από αυτούς από τη Μυτιλήνη, όπου αυτή η δραστική χρησιμοποιείται λίγο πιο συχνά. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν γενικά με την, όχι και τόσο έντονη πίεση επιλογής που δέχονται οι πληθυσμοί, στους οποίους εφαρμόζονται μόνο δολωματικοί ψεκασμοί, ενώ με τα πυρεθροειδή και οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα εφαρμόζονται επίσης και ψεκασμοί κάλυψης. Παρ' όλα αυτά, το εντομοκτόνο spinosad,

χρησιμοποιείται αρκετά χρόνια στα πλαίσια της καταπολέμησης του δάκου, και ειδικά τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί ο αριθμός των εφαρμογών. Επίσης, δεδομένου ότι η ανθεκτικότητα στο Spinosad στο δάκο είναι πολύ πιθανό να εμφανιστεί, όπως στους πληθυσμούς από την Καλιφόρνια (Kakani et al., 2010) και σε εργαστηριακούς πληθυσμούς που υπέστησαν πίεση επιλογής (Sagri et al., 2014), όπως επίσης, σε άλλα Tephritidae έχει σημειωθεί σε εξαιρετικά υψηλά επίπεδα ( $RF > 2000$ ), μετά από πίεση επιλογής στο εργαστήριο (Hsu et al., 2012), είναι πολύ σημαντική η συνεχόμενη παρακολούθηση της κατάστασης της ανθεκτικότητας στο spinosad. Η διατήρηση της αποτελεσματικότητάς του θα πρέπει να αποτελεί προτεραιότητα, η οποία εξαρτάται άμεσα από την καλή διαχείριση της χρήσης του.

Η συχνότητα των μεταλλαγών του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης, G488S και I214V παραμένει σε υψηλά επίπεδα στους περισσότερους πληθυσμούς που ελέγχθηκαν, παρά τη μειωμένη χρήση των εντομοκτόνων αυτών τα τελευταία χρόνια, ενώ η συχνότητα της Δ3Q έλλειψης παραμένει σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Επομένως, οι σημειακές μεταλλαγές G488S και I214V φαίνεται ότι έχουν εγκατασταθεί στους περισσότερους πληθυσμούς. Το γεγονός ότι η ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα είναι στενά συνδεδεμένη με τις μεταλλαγές στόχου στο γονίδιο boAChE (ανασκόπηση από Vontas et al. 2011), υποδεικνύει ότι οι περισσότεροι πληθυσμοί στην Ελλάδα εμφανίζουν αξιόλογα επίπεδα ανθεκτικότητας στο dimethoate, ωστόσο, η πρακτική σημασία αυτού του φαινοτύπου στο πεδίο πρέπει να διαλευκανθεί.

Συμπερασματικά, η συνεχόμενη παρακολούθηση των επιπέδων ανθεκτικότητας, τόσο στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα, όσο και στα υπόλοιπα εντομοκτόνα τα οποία είναι προς χρήση για την καταπολέμηση του δάκου, είναι ζωτικής σημασίας ώστε οι στρατηγικές καταπολέμησης να διαμορφώνονται με βάση τα δεδομένα αυτά, ώστε να οδηγούν στα βέλτιστα δυνατά αποτελέσματα.

### **Κεφάλαιο 3: Ανάλυση μηχανισμού ανθεκτικότητας του δάκου της ελιάς, *Bactrocera oleae*, στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα**

Η ανάλυση της RNA αλληλούχισης πραγματοποιήθηκε από τον Δρ. Ιωαννίδη Παναγιώτη.

### 3.1 Εισαγωγή

Η χρήση πυρεθροειδών εντομοκτόνων τα τελευταία 10-15 χρόνια είναι ευρεία, στο πεδίο της καταπολέμησης του δάκου, *Bactrocera oleae*, είτε με εφαρμογή δολωματικών ψεκασμών ή με ψεκασμούς κάλυψης. Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε πληθυσμούς του πεδίου και η εξέλιξή της μέσα στο χρόνο είναι πλέον γεγονός ((Margaritoroulos et al., 2008, βλ. Κεφ. 2), όπως και η επίδρασή της στην αποτελεσματικότητα των εφαρμογών στο πεδίο (βλ. Κεφ. 2).

Η κατανόηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας είναι πολύ σημαντικό εργαλείο στη διαχείριση της ανθεκτικότητας και κατ' επέκταση στη σωστή δόμηση προγραμμάτων καταπολέμησης. Σε πολλά έντομα η ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα έχει αποδοθεί τόσο σε μεταλλαγές ανθεκτικότητας στα κανάλια νατρίου (Dong et al., 2014) όσο και στο μεταβολισμό τους από ένζυμα αποτοξικοποίησης (Li et al., 2007).

Στα είδη της οικογένειας Tephritidae, η ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα έχει έως τώρα σχετιστεί με ένζυμα αποτοξικοποίησης και όχι με κάποια μεταλλαγή ανθεκτικότητας στόχου (Vontas et al., 2011). Πιο συγκεκριμένα, μελέτες που περιλαμβάνουν βιοδοκιμές τοξικότητας με συνεργιστές και ενζυμικής δραστηριότητας σε πληθυσμούς που έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα πεδίου στα πυρεθροειδή, έχουν δείξει την εμπλοκή εστερασών και οξειδασών του κυτοχρώματος P450 (Margaritoroulos et al., 2008; Wang et al., 2013). Οι ενδείξεις αυτές επιβεβαιώνονται και από αντίστοιχες μελέτες με συνεργιστές σε στελέχη που έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή κάτω από πίεση επιλογής στο εργαστήριο (Arouri et al., 2015; Demant et al., 2019; Hsu et al., 2004).

Το 2008, σε μία ευρεία μελέτη με πληθυσμούς από περιοχές της Ελλάδας καταγράφηκαν χαμηλά έως μέτρια επίπεδα ανθεκτικότητας στο εντομοκτόνο alpha-cypermethrin, στους περισσότερους πληθυσμούς που ελέγχθηκαν και υψηλά επίπεδα σε έναν από αυτούς (Margaritoroulos et al., 2008). Στην ίδια μελέτη, δεδομένα πειράματα ελέγχου δραστηριότητας οξειδασών μικτής δράσης έδειξαν την πιθανή συσχέτιση τους με την ανθεκτικότητα στο alpha-cypermethrin.

Μία πιο πρόσφατη μελέτη του μηχανισμού ανθεκτικότητας του δάκου στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα, πραγματοποιήθηκε με ανάλυση μικροσυστοιχιών ανθεκτικών πληθυσμών σε σχέση με ευαίσθητους (Pavlidí et al., 2018a). Η υπερέκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για οξειδάσες του κυτοχρώματος P450 στους ανθεκτικούς πληθυσμούς, σε σχέση με τους ευαίσθητους, υπέδειξε την εμπλοκή

τους στην ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα. Μεταξύ των γονιδίων των οποίων η έκφραση ήταν διαφοροποιημένη, βρέθηκαν δύο γονίδια που κωδικοποιούν για P450s, τα Contig00436 και Contig02103. Τα γονίδια αυτά ανήκουν στην οικογένεια των CYP6 γονιδίων του κυτοχρώματος P450, πολλά μέλη της οποίας, σχετίζονται με αποτοξικοποίηση εντομοκτόνων σε άλλα έντομα (Feyereisen, 2012). Η πιθανή εμπλοκή ανθεκτικότητας στόχου επίσης ερευνήθηκε όμως δεν βρέθηκε κάποια μεταλλαγή ανθεκτικότητας στο γονίδιο που κωδικοποιεί για το κανάλι νατρίου.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε περαιτέρω ο μηχανισμός ανθεκτικότητας του δάκου στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα. Στόχος ήταν επιβεβαίωση των μέχρι τώρα ευρημάτων για τη συμμετοχή των P450 οξειδασών στην ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα με βιοδοκιμές τοξικότητας με συνεργιστή και αλληλούχηση μεταγραφώματος (RNA αλληλούχηση), καθώς και διερεύνηση του λειτουργικού ρόλου δύο P450 πρωτεϊνών του δάκου με χρήση της τεχνολογίας της RNA παρεμβολής (RNA interference, RNAi).

## **3.2 Υλικά και Μέθοδοι**

### **3.2.1 Πληθυσμοί δάκου**

Όλα τα άτομα συλλέχθηκαν και συντηρήθηκαν όπως περιγράφεται στο Κεφ. 2.2.1, Οι άγριοι πληθυσμοί δάκου που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν κεφάλαιο ήταν οι Κουνουριδιανά, Panagia, Samos, Klima, οι οποίοι συλλέχθηκαν από τις περιοχές: Κουνουριδιανά (ΠΕ Χανίων, Κρήτη), Παναγιά (ΠΕ Ηρακλείου, Κρήτη), Κλήμα (ΠΕ Ηρακλείου, Κρήτη) και Σάμος (ΠΕ Σάμου, Βόρειο Αιγαίο). Ως ευαίσθητοι πληθυσμοί αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν ο εργαστηριακός πληθυσμός HYB, ο οποίος έχει παραμείνει στο εργαστήριο χωρίς έκθεση σε εντομοκτόνα για πάνω από 10 χρόνια, και ο εργαστηριακός πληθυσμός Lab, ο οποίος έχει παραμείνει στο εργαστήριο χωρίς έκθεση σε εντομοκτόνα για πάνω από 30 χρόνια

### **3.2.2 Εργαστηριακές βιοδοκιμές τοπικής εφαρμογής με το συνεργιστή Piperonyl butoxide (PBO)**

Οι δοκιμές τοξικότητας με το συνεργιστή PBO (αναστολέας της δράσης των οξειδασών P450) πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο της τοπικής εφαρμογής όπως περιγράφεται στο Κεφ. 2.2.2. Πριν την εφαρμογή εύρους δόσεων του εντομοκτόνου alpha-cypermethrin (Tagros Chemicals India Ltd, Chennai, India), τα ενήλικα άτομα δάκου που χρησιμοποιήθηκαν ψεκάστηκαν με 1 ul από διάλυμα PBO 1000 mg L-1 (PBO 90% technical grade, Sigma-Aldrich) στη νωτιαία πλευρά του θώρακά τους. Αυτή ήταν η μεγαλύτερη δόση που δεν έδωσε θνησιμότητα με το συνεργιστή στα ευαίσθητα εργαστηριακά άτομα. Καθαρή ακετόνη εφαρμόστηκε στην περίπτωση των μαρτύρων. Τα άτομα αυτά αφέθηκαν για δύο ώρες να ανακάμψουν πριν την εφαρμογή του εντομοκτόνου alpha-cypermethrin. Στη συνέχεια 20-25 ενήλικα άτομα χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε δόση εντομοκτόνου, ενώ εφαρμόστηκαν 5-7 δόσεις, συμπεριλαμβανομένου του μάρτυρα (καθαρή ακετόνη). Η θνησιμότητα καταγράφηκε 48 ώρες μετά την εφαρμογή του εντομοκτόνου.

Οι βιοδοκιμές που έγιναν μόνο με το εντομοκτόνο alpha-cypermethrin πραγματοποιήθηκαν όπως στο Κεφ. 2.2.2.

### **3.2.3 RNA αλληλούχιση**

Οι άγριοι πληθυσμοί Κουπουριδiana, Panagia, Samos και ο εργαστηριακός Lab, επιλέχθηκαν μετά τη διεξαγωγή βιοδοκιμών τοξικότητας με τη δραστική ουσία alpha-cypermethrin. Τέσσερα δείγματα (βιολογικές επαναλήψεις), που το κάθε ένα περιλάμβανε 5 θηλυκά ενήλικα άτομα δάκου ηλικίας 3-5 ημερών εστάλησαν από κάθε ένα πληθυσμό στο McGill Genome Center (Montreal, Canada). Τα δείγματα διατηρήθηκαν σε RNAlater (Sigma-Aldrich) μέχρι τη διεξαγωγή της απομόνωσης του ολικού RNA, με QIAGEN RNA Extraction Mini Kit (QIAGEN, Germany). Η σύνθεση του cDNA έγινε με Superscript III reverse transcription kit, από 1 µg RNA, και με poly dT εκκινητές. Για τη δημιουργία των βιβλιοθηκών χρησιμοποιήθηκε το Illumina TruSeq Library Prep Kit v2 (catalog number: #RS-122-2001).

### 3.2.4 Απομόνωση RNA, σύνθεση cDNA (αντίστροφη μεταγραφή) και ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου

Η απομόνωση του ολικού RNA πραγματοποιήθηκε με το διάλυμα TRI Reagent (Sigma-Aldrich) το οποίο αποτελεί μίγμα θειοκυανικής γουανιδίνης – φαινόλης. Αναλυτικά τα βήματα που ακολουθήθηκαν:

1. Ομογενοποίηση δειγμάτων (3-5 ενηλίκων ατόμων δάκου) σε 500 ul TRI Reagent.
2. Φυγοκέντρηση σε 12000 rpm, για 10 min στους 4 °C. Το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρεται σε 1,5 ml eppendorf tube και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5min.
3. Προσθήκη 100 ul χλωροφορμίου και ισχυρή ανάμειξη για 30 sec. Στην συνέχεια το δείγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 min.
4. Φυγοκέντρηση στους 4 °C σε 12000 rpm, για 15 min για το διαχωρισμό του μείγματος σε τρεις φάσεις: την υπερκείμενη άχρωμη υδατική φάση που περιέχει κυρίως RNA, την ενδιάμεση φάση που περιέχει κυρίως DNA και την υποκείμενη οργανική φάση.
5. Η υδατική φάση (> 275 ul) μεταφέρεται σε νέο eppendorf tube 1,5 ml και προστίθεται ίση ποσότητα ισοπροπανόλης για την κατακρήμνιση του RNA. Ανακίνηση του μίγματος για 15 sec και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. Φυγοκέντρηση σε 12000 rpm, για 10 min στους 4 °C.
6. Αφαίρεση του υπερκείμενου διαλύματος και πλύσιμο με 1000 ul αιθανόλης 75%. Παραμονή του ιζήματος στο διάλυμα αιθανόλης για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Φυγοκέντρηση στα 7500 rpm για 5 λεπτά στους 4 °C.
7. Αφαίρεση αιθανόλης και παραμονή του ιζήματος σε απαγωγό σε θερμοκρασία δωματίου, για ~5 min ώστε να στεγνώσει. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 30 μl DEPC ddH<sub>2</sub>O (nuclease free).
9. Το παραχθέν RNA επεξεργάστηκε με DNase I (ThermoFisher Scientific) ακολουθώντας το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

Ο προσδιορισμός της ποσότητας και της καθαρότητας του ολικού RNA που απομονώθηκε έγινε σε φασματοφωτόμετρο μικρού όγκου. Ο λόγος της των απορροφήσεων  $A_{260nm}/A_{280nm}$  που προσδιορίζει την καθαρότητα του δείγματος, σε όλα

τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 1,8-2,2, Ο έλεγχος της ποιότητας του ολικού RNA που απομονώθηκε έγινε με ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v.

Η σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA), με μήτρα το ολικό RNA, πραγματοποιήθηκε με το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse Transcriptase) (Minotech RT ) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. 1 µg από το ολικό RNA χρησιμοποιήθηκε σε κάθε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής και ως εκκινητές στην χρησιμοποιήθηκαν ολιγονουκλεοτίδια δεοξυθυμιδίνης (oligo-dT), μεγέθους 20 νουκλεοτιδίων.

Τα παραχθέντα cDNAs χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα σε ποσοτικές αντιδράσεις πραγματικού χρόνου (quantitative Real time PCR, qRT PCR). Οι qRT PCR αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με το Kapa SYBR Fast qPCR 2x Master Mix (Kapa Biosystems, Inc) σε τελικό όγκο 20 µl. Από κάθε cDNA αραιωμένο 60 φορές προστέθηκαν 2 µl σε κάθε αντίδραση και κάθε εκκινητής σε τελική συγκέντρωση 0,5 µM. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τουλάχιστον 4 βιολογικές επαναλήψεις. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν δίνονται στον Πίνακα 3.1 Για τα νέα ζεύγη των εκκινητών πραγματοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη για τον υπολογισμό της απόδοσης της κάθε αντίδρασης. Ως γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν η 40s ριβοσωμική πρωτεΐνη (RPS7) και η β-ακτίνη (beta-actin) (Pavlidis et al., 2018a). Για τον έλεγχο της ειδικότητας των προϊόντων πραγματοποιήθηκε παραγωγή καμπυλών τήξης. Το θερμικό πρωτόκολλο της αντίδρασης ήταν 95 °C για 3 min, και 35 κύκλους των: 95 °C για 30 sec, 58 °C για 30 sec και 60 °C για 30 sec. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη προσέγγιση της σχετικής ποσοτικοποίησης μέσω της μεθόδου σύγκρισης των Ct (Comparative Ct method), της μεθόδου του Pfaffl (Pfaffl, 2001) και του λογισμικού REST (v.2019).

**Πίνακας 3.1: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις qPCR αντιδράσεις.**

Γονίδιο	Εκκινητής (5' → 3')	Πηγή
CYP6A23	For (TGGAGCAAGTAATATCAGAGACAT)	
	Rev (TATTCGGGGTCATGGTGTAGC)	
CYP6G2	For (CGAGCGCTAATGAAGAAGGT)	
	Rev (TCGGGTAGAAAACGATCAGG)	
BETA-ACTIN	For (CGGTATCCACGAAACCACAT)	Pavlidis et al. 2018



	Rev (ATTGTTGATGGAGCCAAAGC)	
RPS7	For (TTCGGTAGCAAGAAGGCTGT)	Pavliidi et al. 2008
	Rev (GGTAGGTTTGGGCAGGATTT)	

### 3.2.5 Γονιδιακή σίγηση με την τεχνολογία της RNA παρεμβολής (RNAi)

Για τη δημιουργία του δίκλωνου μορίου RNA (dsRNA), αρχικά πραγματοποιήθηκε PCR με μήτρα cDNA από ανθεκτικό πληθυσμό δάκου (Κουπουριδιανία). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν δίνονται στον Πίνακα 3.2, Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν: 95 °C for 5 min, 35 cycles of [94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 40 s], 72 °C 10 min.

Ακολούθησε καθαρισμός των παραχθέντων PCR προϊόντων με NucleoSpin Gel and PCRClean-up (Macherey - Nagel), τα οποία εν συνεχεία χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα για τη σύνθεση των dsRNA μορίων. Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε με το HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit (New England Biolabs), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μετά τη σύνθεση, το παραχθέν dsRNA καθαρίστηκε με εκχύλιση με φαινόλη:χλωροφόρμιο και ανάκτηση του RNA με κατακρήμνιση με αιθανόλη. Η ποιότητα των προϊόντων ελέγχθηκε σε 1,5 % w/v πηκτή αγαρόζης και η συγκέντρωση του κάθε δείγματος προσδιορίστηκε με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου μικρού όγκου.

**Πίνακας 3.2: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση των δίκλωνων μορίων RNA (dsRNA).**

dsRNA	Εκκινητής (5' → 3')
dsLacZ	For (TAATACGACTCACTATAGGGAGA AGGCAGGCTAATGACTATGGAG)
	Rev (TAATACGACTCACTATAGGGAGA GAAGCCGGTATGTCACTCAGT)
DsCYP6A23	For (TAATACGACTCACTATAGGGA GACACAGTTAATGAAATTGTT)
	Rev (TAATACGACTCACTATAGGGA GAGAAAACCTTGAATGTCTC)

dsCYP6G2	For ( <u>TAATACGACTCACTATAGGGAGA</u> _TCAGTCGTTCAAATACGCCAGT)
	Rev ( <u>TAATACGACTCACTATAGGGAGA</u> _TCCTTCCATCTTGGGTTCTTAGC)

Το dsRNA εισήχθη σε ενήλικα άτομα δάκου ηλικίας 1-3 ημερών, με μικροενέσεις με βάση τους (Huang et al., 2015). Συνοπτικά, αφού τα έντομα αφέθηκαν σε πάγο ωστόσο αναισθητοποιηθούν, σε κάθε άτομο, περίπου 1 µg dsRNA ενέθηκε, μεταξύ του πρώτου και του δεύτερου κοιλιακού τμήματος. Οι ενέσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του Nanoject II Auto-Nanoliter Injector (Drummond Scientific, Broomall, PA, USA). Τα άτομα που χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρες ενέθηκαν με dsLacZ. Σε κάθε επανάληψη του πειράματος ενέθηκαν περίπου 25-30 άτομα για κάθε γονίδιο και για το μάρτυρα. Η θνησιμότητα από τις ενέσεις ήταν πολύ χαμηλή (<5%). Τα ενεμένα άτομα, διατηρήθηκαν σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας και φωτοπεριόδου και σταθερής παροχής τροφής (βλ. Κεφ. 2.2.1)

Ο έλεγχος των επιπέδων της έκφρασης των γονιδίων-στόχων έγινε σε 5 άτομα που συλλέχθηκαν 24 ώρες μετά την εισαγωγή του dsRNA, με ποσοτική RT-PCR (βλ. Κεφ. 3.2.4). Τα υπόλοιπα άτομα χρησιμοποιήθηκαν σε διαγνωστικές βιοδοκιμές τοξικότητας, με τη συγκέντρωση εντομοκτόνου που αντιστοιχεί στο LC15 του πληθυσμού που χρησιμοποιήθηκε, όπως περιγράφονται στο Κεφ. 2.2.2 με το εντομοκτόνο alpha-cypermethrin.

### 3.3 Αποτελέσματα

#### 3.3.1 Επίδραση του συνεργιστή PBO στην τοξικότητα του εντομοκτόνου alpha-cypermethrin

Για τη διερεύνηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας, πραγματοποιήθηκαν βιοδοκιμές τοξικότητας με το συνεργιστή PBO στον πληθυσμό Kounouridiana και στον εργαστηριακό πληθυσμό HYB. Σε ενήλικα άτομα δάκου και από τους δύο πληθυσμούς εφαρμόστηκε ο συνεργιστής PBO 2 ώρες πριν την εφαρμογή του εντομοκτόνου alpha-cypermethrin. Απ' όσο φαίνεται, και στους δύο πληθυσμούς ο συνεργιστής PBO ενίσχυσε την επίδραση του alpha-cypermethrin και στους δύο πληθυσμούς. Στον

πληθυσμό Kounouridiana η ευαισθησία στο εντομοκτόνο αυξήθηκε κατά 28 φορές, υποδεικνύοντας υψηλή συνεργιστική δράση, ενώ στον πληθυσμό HYB η αύξηση της ευαισθησίας ήταν αρκετά μικρότερη (κατά 8 φορές) (Πίνακας 3.3). Όπως παρατηρείται, μετά την εφαρμογή του PBO στον πληθυσμό Kounouridiana η μέση τιμή LC50 έπεσε από 49,66 mg L<sup>-1</sup> σε 1,74 mg L<sup>-1</sup>, δηλαδή στα ίδια επίπεδα με αυτή του πληθυσμού HYB (1,31 mg L<sup>-1</sup>), χωρίς εφαρμογή PBO.

**Πίνακας 3.3: Επίδραση του συνεργιστή PBO στην τοξικότητα του εντομοκτόνου alpha-cypermethrin σε ανθεκτικό άγριο (Kounouridiana) και ευαίσθητο εργαστηριακό πληθυσμό (Hybrid).**

Πληθυσμός	Συνεργιστής	N	Slope±SE	LC50 <sup>a</sup> (95% CL)	χ <sup>2</sup>	df	SR <sup>b</sup> (95% CL)
Kounouridiana	-	120	2,032±0,347	49,66 (28,51 - 86,82)	10,44 <sup>c</sup>	8	1
Kounouridiana	PBO	107	3,312±1,149	1,75 (0,59 - 2, 88)	3,27 <sup>c</sup>	10	28,26 <sup>d</sup> (14,54 - 54,94)
Hybrid	-	138	5,26±1,27	1,31 (0,75 - 1,74)	13,26 <sup>c</sup>	10	1
Hybrid	PBO	93	2,98±0,76	0,15 (0,08 - 0,23)	2,1 <sup>c</sup>	6	8,9 <sup>d</sup> (5,3 - 14,95)

<sup>a</sup> LC50 τιμές σε mg L<sup>-1</sup>

<sup>b</sup> SR: ο συντελεστής συνεργισμού

<sup>c</sup> Έλεγχος καλής προσαρμογής

<sup>d</sup> Ο συντελεστής συνεργισμού (SR) είναι στατιστικά διαφορετικός (P<0,05) όταν τα διαστήματα εμπιστοσύνης (95% CL) δεν περιλαμβάνουν το 1

### 3.3.2 Αποτελέσματα RNA αλληλούχισης

Οι πληθυσμοί Kounouridiana, Panagia, Samos και Lab υποβλήθηκαν σε βιοδοκιμές τοξικότητας με το εντομοκτόνο alpha-cypermethrin. Με βάση τους συντελεστές ανθεκτικότητας (RF) και την κατάταξη των Torres-Vila et al. (2002a, b) (Βλ. Κεφ. 2.2.2) οι πληθυσμοί Kounouridiana και Panagia (RF=119 και 115 αντίστοιχα) εμφανίζουν πολύ υψηλή ανθεκτικότητα, ο πληθυσμός Samos (RF=13), μέτρια ανθεκτικότητα και ο εργαστηριακός πληθυσμός Lab είναι ευαίσθητος για το εντομοκτόνο alpha-cypermethrin (Πίνακας 3.4)

**Πίνακας 3.4: Αποτελέσματα βιοδοκιμών τοξικότητας με alpha-cypermethrin, στους άγριους πληθυσμούς και στον ευαίσθητο εργαστηριακό πληθυσμό (LAB), οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση μεταγραφώματος.**

Strain	N	LC50 (95% CI)	Slope±SE	x2	df	RR (95% CI)
Lab	137	0,417 (0,24 - 0,66)	2,206±0,324	11,49	8	1
Samos	113	5,45 (2,19 - 9,89)	1,630±0,295	7,72	7	13,07 (7,55 - 22,62)
Panagia	126	48,11 (33,306 - 70,83)	2,163±0,361	3,84	8	115,31 (70,64 - 188,24)
Kounoupidiana	120	49,67 (28,52 - 86,82)	2,032±0,347	10,44	8	119,03 (72,20 - 196,24)

Οι ανωτέρω πληθυσμοί δάκου επιλέχθηκαν για ανάλυση RNA αλληλούχισης ώστε να συγκριθούν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων μεταξύ τους. Συγκεκριμένα η σύγκριση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκε μεταξύ των πολύ ανθεκτικών πληθυσμών Kounoupidiana και Panagia σε σχέση με τον ευαίσθητο εργαστηριακό πληθυσμό Lab και σε σχέση με τον μετρίως ανθεκτικό πληθυσμό πεδίου Samos. Η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA) έδειξε ότι οι βιολογικές επαναλήψεις των 4 πληθυσμών ήταν ξεκάθαρα διαχωρισμένες μεταξύ τους (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία).

Η ανάλυση της διαφοροποιημένης έκφρασης έδειξε ότι μεταξύ των γονιδίων αποτοξικοποίησης, βρέθηκαν να υπερεκφράζονται 13 γονίδια P450 οξειδασών και 4 γονίδια UDP-γλυκουρονοσυλ-τρανσφερασών (UDP glucosyltransferases, UGTs) (Πίνακας 3.5). Από αυτά, 5 P450 γονίδια έδειξαν αυξημένη έκφραση στους πολύ ανθεκτικούς πληθυσμούς Kounoupidiana και Panagia, σε σχέση με τον ευαίσθητο πληθυσμό Lab. Τα γονίδια αυτά, βάσει της επι-σημείωσής (annotation) τους μοιάζουν με τα *CYP6A23*, *CYP313A4*, *CYP6G2* και το παράλογό του, και το *CYP9B2*. Μόλις 1 P450 γονίδιο, το *CYP6G2*, υπερεκφράζεται στους πληθυσμούς Kounoupidiana και Panagia, σε σχέση με τον εργαστηριακό πληθυσμό Lab αλλά και σε σχέση με τον μετρίως ανθεκτικό Samos.

**Πίνακας 3.5: Διαφοροποιημένη έκφραση των γονιδίων αποτοξοκοποίησης στους άγριους πληθυσμούς Κουνουριδιανία (K) και Panagia (P) σε σχέση με τον ευαίσθητο εργαστηριακό Lab (L) και τον μετρίως ανθεκτικό άγριο πληθυσμό Samos (S).**

Gene id	K-L Log <sub>2</sub> FC <sup>a</sup>	P-L Log <sub>2</sub> FC <sup>a</sup>	K-S Log <sub>2</sub> FC <sup>a</sup>	P-S Log <sub>2</sub> FC <sup>a</sup>	Annotation
LOC106618206-00002	3,693	3,198	2,714	2,23	CYP6g2 – contig02103
LOC106618206-00001	3,469	3,005	2,091	N/A	CYP6g2 – contig02103 paralog
LOC106615810	2,132	N/A	N/A	N/A	CYP18A1
LOC118680302	2,219	N/A	N/A	N/A	CYP4D2
LOC106618459	2,808	2,745	N/A	N/A	CYP9B2
LOC106622341	2,035	N/A	N/A	N/A	CYP12A2
LOC118679942	4,942	N/A	N/A	N/A	CYP12A2
LOC106622342	2,291	N/A	N/A	N/A	CYP450 12A4
LOC106622736	2,395	N/A	N/A	N/A	CYP12E1
LOC106622732	2,37	N/A	N/A	N/A	CYP12E1
LOC106617790	3,361	N/A	N/A	N/A	CYP304A1
LOC106622034	4,365	4,138	N/A	N/A	CYP313A4
LOC106620242	5,436	4,638	N/A	N/A	CYP6A23 – CONTIG00436
LOC118682404	2,204	N/A	N/A	N/A	UGT2-LIKE
LOC106623376	3,253	N/A	N/A	N/A	UGT4-LIKE
LOC118682405	3,114	N/A	N/A	N/A	UGT4-LIKE
LOC118680791	2,737	N/A	N/A	N/A	UGT4-LIKE

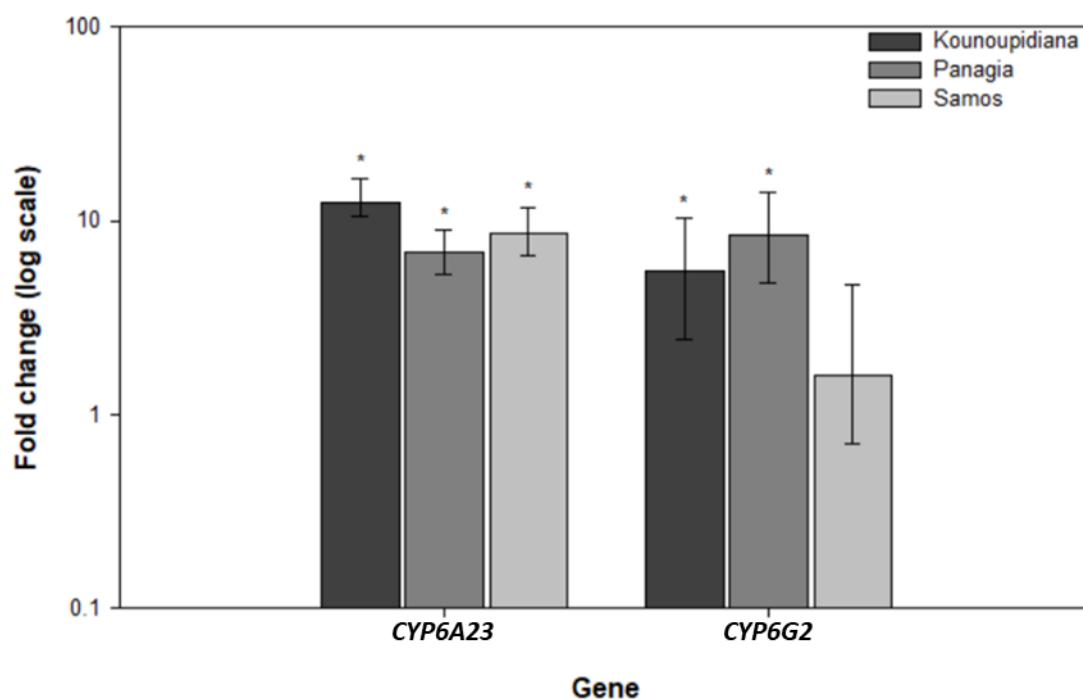
<sup>a</sup> Log<sub>2</sub>FC: Λογάριθμος του λόγου έκφρασης (Fold Change, FC)

### 3.3.3 Επιβεβαίωση της υπερέκφρασης των γονιδίων *CYP6A23* και *CYP6G2* σε άγριους πληθυσμούς δάκου

Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *CYP6A23* και *CYP6G2* ελέγχθηκαν, με qPCR, στους τρεις άγριους πληθυσμούς Κουνουριδιανία, Panagia και Samos, σε σχέση με τον ευαίσθητο εργαστηριακό Lab.

Το γονίδιο *CYP6A23* βρέθηκε να υπερεκφράζεται και στους τρεις πληθυσμούς (Εικόνα 3.1) σε σχέση με το ευαίσθητο Lab. Τα επίπεδα έκφρασης ήταν 12,5, 6,9 και 8,5 φορές πάνω, στους πληθυσμούς Κουνουριδιανία, Panagia και Samos αντίστοιχα, σε σχέση με τον Lab. Το γονίδιο *CYP6G2* βρέθηκε να υπερεκφράζεται στους δύο πολύ υψηλά ανθεκτικούς πληθυσμούς (Εικόνα 3.1) Κουνουριδιανία και Panagia (5,5 και 8,5

φορές περισσότερο, αντίστοιχα). Στον πληθυσμό Samo, η διαφοροποίηση της έκφρασης σε σχέση με το Lab δεν ήταν στατιστικά σημαντική.



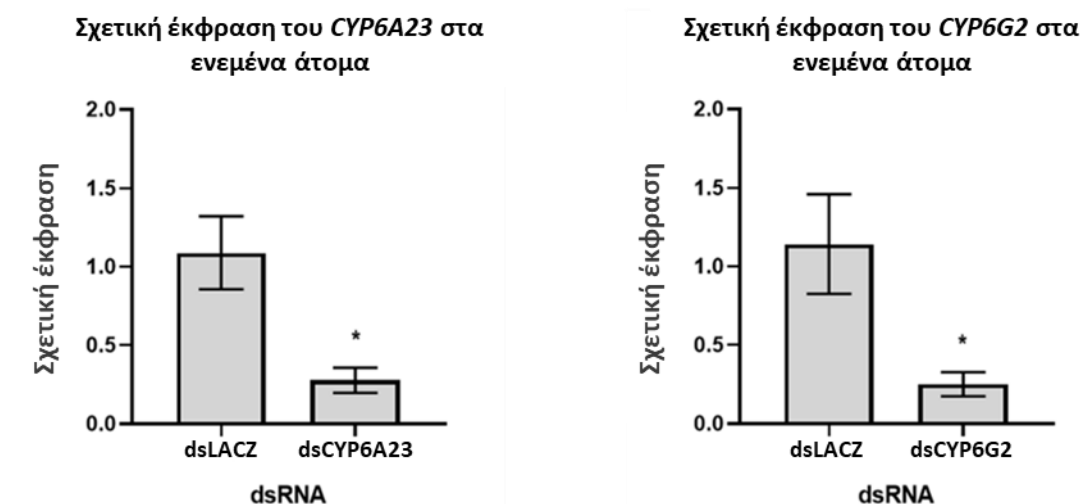
Εικόνα 3.1: Ανάλυση έκφρασης των P450 γονιδίων *CYP6A23* και *CYP6G2* στους δύο πολύ ανθεκτικούς στο alpha-cypermethrin πληθυσμούς (Κουνουπιδιανά, Παναγιά) και του μετρίως ανθεκτικού (Σάμος) σε σχέση με τον ευαίσθητο εργαστηριακό (Lab). Οι μπάρες σφάλματος αναπαριστούν το 95% διάστημα εμπιστοσύνης. Οι αστερίσκοι (\*) σημαίνουν στατιστικά σημαντική υπερέκφραση.

### 3.3.4 Λειτουργική ανάλυση του ρόλου των γονιδίων *CYP6A23* και *CYP6G2*

Ο ανθεκτικός άγριος πληθυσμός Klima χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα της λειτουργικής ανάλυσης του ρόλου των γονιδίων *CYP6A23* και *CYP6G2*.

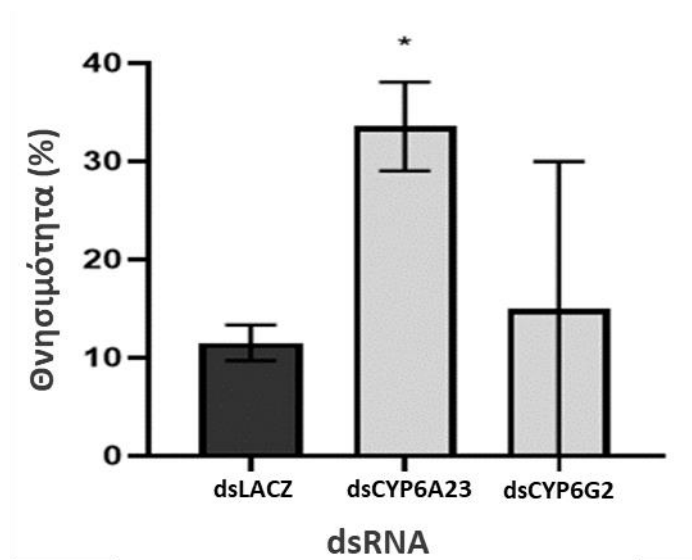
Η έκφραση των γονιδίων *CYP6A23* και *CYP6G2* ελέγχθηκε σε ενεμένα με dsRNA ενήλικα άτομα δάκου, τα οποία συλλέχθηκαν 24 ώρες μετά τις ενέσεις. Όπως φαίνεται στα γραφήματα της Εικόνας 3.2, τα επίπεδα έκφρασης του *CYP6A23* και του *CYP6G2* μειώθηκαν στα ds*CYP6A23* (ενεμένα με dsRNA-*CYP6A23*) και ds*CYP6G2* (ενεμένα με dsRNA-*CYP6G2*) άτομα κατά ~70% και ~75% αντίστοιχα, σε σχέση με τα dsLACZ

(ενεμένα με dsRNA- LACZ) άτομα (μάρτυρες). Επομένως, η τεχνική του RNAi μείωσε αποτελεσματικά την έκφραση των γονιδίων-στόχων.



**Εικόνα 3.2: Επιβεβαίωση της RNAi γονιδιακής σίγησης. Τα επίπεδα της σχετικής έκφρασης σε ενεμένα άτομα δάκου 24 ώρες μετά τις ενέσεις. Οι αστερίσκοι (\*) δείχνουν τη στατιστική σημαντικότητα σε επίπεδο  $P < 0,05$ . Οι μπάρες σφάλματος αναπαριστούν το τυπικό σφάλμα από τη μέση τιμή.**

Οι διαγνωστικές βιοδοκιμές τοξικότητας στα ενεμένα ενήλικα άτομα δάκου, με τη δραστική ουσία alpha-cypermethrin, πραγματοποιήθηκαν 72 ώρες μετά τις ενέσεις με dsRNA. Η θνησιμότητα για τα άτομα dsLACZ, ds00436 και ds02103 παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.3. Όπως φαίνεται, η μείωση της έκφρασης του γονιδίου *CYP6A23* αύξησε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό την ευαισθησία των ατόμων στη δραστική alpha-cypermethrin (Μέση θνησιμότητα 33,5%). Μετά τη μείωση της έκφρασης του *CYP6G2*, δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στην τοξικότητα του alpha-cypermethrin (Μέση θνησιμότητα 15%). Η θνησιμότητα στα dsLACZ άτομα (Μέση θνησιμότητα 11,5%) δεν επηρεάστηκε από την εισαγωγή του dsRNA- LACZ.



**Εικόνα 3.3:** Θνησιμότητα ατόμων δάκου που εκτέθηκαν στο *alpha-cypermethrin* 72 ώρες μετά τις ενέσεις με dsRNA. Διαγνωστική δόση 30 mg L<sup>-1</sup>. Οι αστερίσκοι (\*) δείχνουν τη στατιστική σημαντικότητα σε επίπεδο P<0,05. Η σύγκριση των μέσων τιμών έγινε με μη-συσχετισμένο έλεγχο t (independent t-test). Οι μπάρες σφάλματος αναπαριστούν το τυπικό σφάλμα από τη μέση τιμή.

### 3.4 Συζήτηση

Στο προηγούμενο κεφάλαιο έχει δειχθεί ότι ο δάκος της ελιάς έχει αναπτύξει ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα σε αρκετές περιοχές της Ελλάδας. Η περιορισμένη διαθεσιμότητα δραστικών ουσιών για την αντιμετώπιση του εχθρού, είτε λόγω εμφάνισης ανθεκτικότητας, είτε λόγω απόσυρσής τους από την Ευρωπαϊκή Ένωση, καθιστά περισσότερο από ποτέ απαραίτητη τη διεξαγωγή ενεργειών η οποίες θα συντελέσουν στην καλύτερη διαχείριση της ανθεκτικότητας και κατ' επέκταση την πιο αποτελεσματική καταπολέμηση του εχθρού. Η μελέτη των μηχανισμών ανθεκτικότητας είναι αναπόσπαστο κομμάτι της διαχείρισης της ανθεκτικότητας, συμβάλλοντας στην εύρεση νέων μεθόδων παρακολούθησής της ή/και ακόμα στη δημιουργία νέων, βελτιωμένων σκευασμάτων καταπολέμησης.

Στο υπό συζήτηση κεφάλαιο πραγματοποιήθηκε μία σειρά πειραματικών εργασιών με στόχο την κατανόηση του μηχανισμού ανθεκτικότητας του δάκου στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν 3 άγριοι πληθυσμοί (Kounouridiana, Panagia, Klima) από την περιοχή της Κρήτης, οι οποίοι βρέθηκαν υψηλά ανθεκτικοί στο εντομοκτόνο *alpha-cypermethrin*, ένας άγριος πληθυσμός από



το νησί της Σάμου (Samos) ο οποίος έχει χαρακτηριστεί ως μέτρια ανθεκτικός και ένας ευαίσθητος εργαστηριακός πληθυσμός (Lab).

Οι βιοδοκιμές τοξικότητας με το συνεργιστή PBO (αναστολέας της δράσης των P450 μονοοξυγενασών) έδειξαν ότι η ευαισθησία στη δραστική ουσία alpha-cypermethrin αυξήθηκε σε μεγάλο βαθμό (SR = 28). Είναι γεγονός ότι, παρόμοια επίπεδα συνεργισμού έχουν καταγραφεί ξανά μόνο σε άλλα δύο είδη της οικογένειας Terphritidae, ανθεκτικά σε πυρεθροειδή εντομοκτόνα, στην περίπτωση του *Bactrocera dorsalis* (Hsu et al., 2004) στο πυρεθροειδές fenvalerate, και της μύγας της Μεσογείου *Ceratitis capitata* (Arouri et al., 2015) στο lambda-cyhalothrin. Ωστόσο αξίζει να σημειωθεί ότι και στις δύο αυτές περιπτώσεις οι πληθυσμοί που χρησιμοποιήθηκαν είχαν υποστεί πίεση επιλογής στο εργαστήριο για πάνω από 30 γενιές.

Τα δεδομένα από τα πειράματα συνεργισμού αποτελούν ισχυρή ένδειξη της πιθανής εμπλοκή των P450 μονοοξυγενασών στην ανθεκτικότητα στο alpha-cypermethrin, γεγονός που συμφωνεί με προηγούμενη μελέτη, όπου πειράματα ενζυμικής δραστηριότητας έδειξαν την πιθανή εμπλοκή των P450s στην ανθεκτικότητα στην εν λόγω δραστική ουσία σε έναν ανθεκτικό και μερικούς ακόμα μετρίως ανθεκτικούς πληθυσμούς από την Ελλάδα (Margaritoroulos et al. 2008). Επιπροσθέτως, ήδη ανθεκτικά στο alpha-cypermethrin άτομα από πληθυσμούς από την Κρήτη ελέγχθηκαν για την παρουσία μεταλλαγών ανθεκτικότητας στο VGSC, όμως καμία μεταλλαγή που να σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα δε βρέθηκε (Pavlidis et al., 2018a).

Η ανάλυση της RNA αλληλούχισης υποδηλώνει την εμπλοκή πολλαπλών P450 μονοοξυγενασών στο φαινότυπο της ανθεκτικότητας, δεδομένου ότι μεταξύ των γονιδίων αποτοξικοποίησης, βρέθηκαν να υπερεκφράζονται 13 γονίδια P450 οξειδασών. Μάλιστα, επιβεβαιώνει το γεγονός ότι η υπερέκφραση των γονιδίων *CYP6A23* και *CYP6G2*, με βάση την ανάλυση μικροσυστοιχιών που έχει προηγηθεί από τους (Pavlidis et al., 2018a), σε ανθεκτικούς από την Κρήτη πληθυσμούς, πιθανότατα σχετίζεται με το φαινότυπο της ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα.

Και τα δύο αυτά γονίδια ανήκουν στην οικογένεια CYP6 των P450 μονοοξυγενασών, η οποία έχει δείχθει ότι τα μέλη της παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα σε πολλά έντομα (Feyereisen, 2012). Το γονίδιο *CYP6A23* είναι ορθόλογο του γονιδίου *CYP6A51* της μύγας της Μεσογείου, *C. capitata*. Το *CYP6A51* αρχικά σχετίστηκε με την ανθεκτικότητα στο lambda-cyhalothrin (Arouri et al., 2015) και στη συνέχεια φάνηκε ότι μεταβολίζει τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα lambda-

cyhalothrin και deltamethrin, ενώ και η λειτουργική της ανάλυση έδειξε ότι συμβάλλει στην ανθεκτικότητα σε αυτά (Tsakireli et al., 2019). Το ορθόλογο του *CYP6G2* έχει δειχθεί ότι μεταβολίζει το εντομοκτόνο imidacloprid και συνεισφέρει στην ανθεκτικότητα στη *Drosophila melanogaster* (Denecke et al., 2017), καθώς και στην αποτοξικοποίηση της δραστικής ivermectin (Kim et al., 2018).

Η διαφοροποίηση της έκφρασης των γονιδίων *CYP6A23* και *CYP6G2* επιβεβαιώθηκε με qRT PCR στους άγριους πληθυσμούς Κουνουριδιανά, Παναγιά, Σάμος και Κουνουριδιανά, Παναγιά αντίστοιχα. Όπως φαίνεται, το γονίδιο *CYP6A23* πιθανόν υπερεκφράζεται πιο σταθερά στους άγριους πληθυσμούς, γεγονός που μπορεί να σχετίζεται με την έκθεσή τους στα εντομοκτόνα ή ακόμα με άλλους παράγοντες στους οποίους εκτίθενται στο περιβάλλον που ζουν και στους οποίους χρειάζεται να προσαρμοστούν (ανασκόπηση από Liu, 2015; Lu et al., 2021). Το γονίδιο *CYP6G2* δείχνει, στους πληθυσμούς που ελέγχθηκαν, να αντικατοπτρίζει το φαινότυπο της ανθεκτικότητας στο εντομοκτόνο alpha-cypermethrin, γεγονός που ίσως υποδεικνύει ότι τα επίπεδα έκφρασής του συνδέονται πιο στενά με την έκθεση στα εντομοκτόνα και συγκεκριμένα τα πυρεθροειδή.

Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός των δύο γονιδίων με την τεχνική του RNAi έδειξε ότι η σιώπηση του *CYP6A23* προκάλεσε μία αύξηση της ευαισθησίας στη δραστική alpha-cypermethrin, υποδηλώνοντας ότι μπορεί να παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην αποτοξικοποίηση των πυρεθροειδών εντομοκτόνων. Η σιώπηση του *CYP6G2*, δεν προκάλεσε κάποια αλλαγή στην ευαισθησία στο εντομοκτόνο.

Τέλος, υπάρχουν αρκετά δεδομένα πλέον που συνδέουν την υπερέκφραση αυτών των δύο κυτοχρωμικών P450 πρωτεϊνών με την ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα, οπότε ο έλεγχός των επιπέδων της έκφρασής τους μπορεί να αποτελέσει μοριακή διαγνωστική μέθοδο για την παρουσία ανθεκτικότητας σε άγριους πληθυσμούς.

## Κεφάλαιο 4: Ανάλυση του μηχανισμού ανθεκτικότητας της επιδερμίδας στο φορέα της ελονοσίας *Anopheles gambiae*

Αυτό το κεφάλαιο αναδιατυπώθηκε από μέρος των:

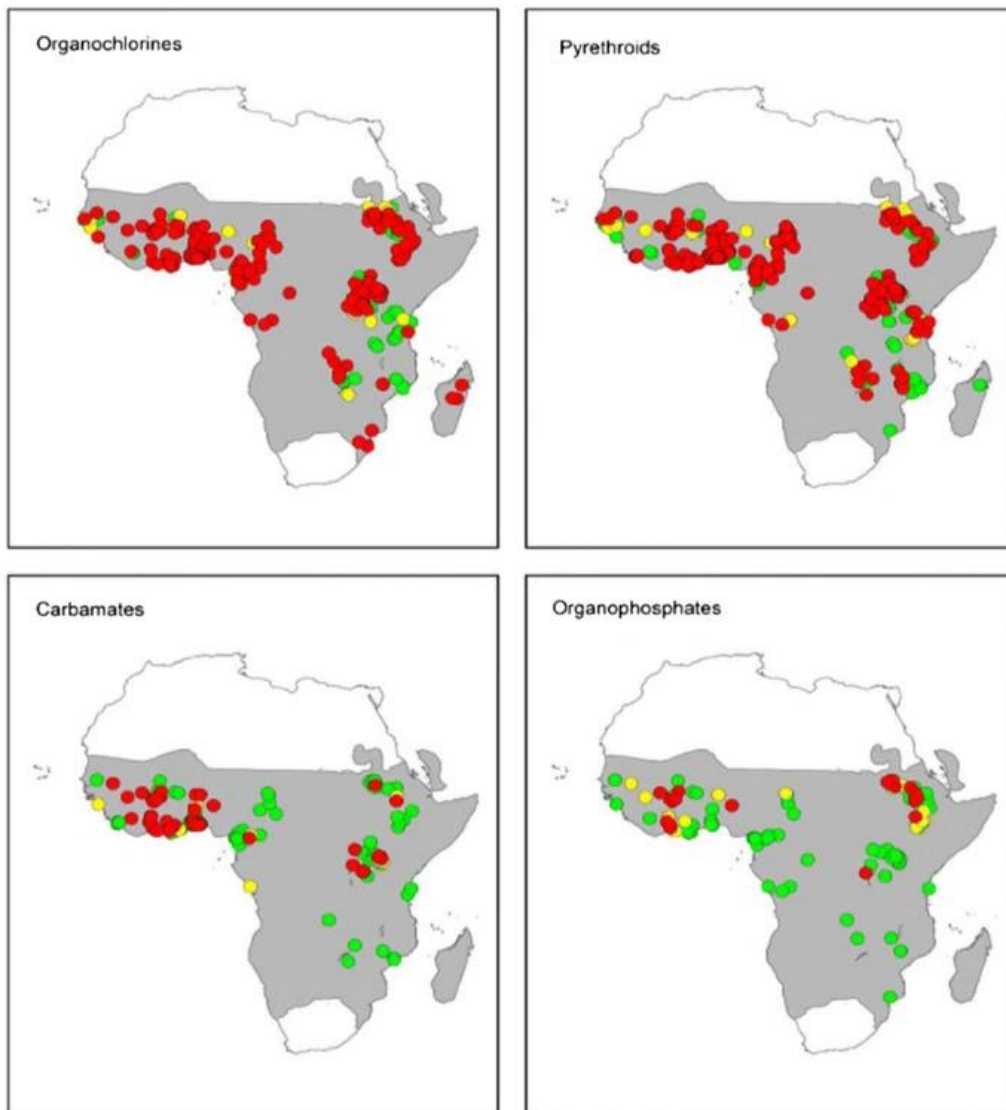
Balabanidou V, Kampouraki A, MacLean M, Blomquist GJ, Tittiger C, Juárez MP, Mijailovsky SJ, Chalepakis G, Anthousi A, Lynd A, Antoine S., Hemingway J., Ranson H., Lycett G.J., and Vontas J., 2016, Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae*. Proc Natl Acad Sci USA. 113:201608295, <https://doi.org/10.1073/pnas.1608295113>

Balabanidou V., Kefi M., Aivaliotis M., Koidou V., Girotti J. R., Mijailovsky S. J., Juárez M. P., Papadogiorgaki E., Chalepakis G., Kampouraki A., Nikolaou C., Ranson H., and John Vontas (2019). Mosquitoes cloak their legs to resist insecticides. Proc. R. Soc. B 286, 20191091, <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.1091>

## 4.1 Εισαγωγή

Η ελονοσία μεταδίδεται από πολλά είδη του γένους *Anopheles* με έναν από τους κυριότερους φορείς στην Αφρική, το είδος *Anopheles gambiae*. Η πρόληψη της ελονοσίας στην Αφρική βασίζεται σχεδόν εξ' ολοκλήρου στη χρήση εντομοκτόνων, είτε με τη μορφή των προστατευτικών διχτυών (κουνουπιέρες, σίτες) εμποτισμένα με μακράς διάρκειας εντομοκτόνα (Long-Lasting Insecticidal Nets, LLINs) ή με τη μορφή υπολειμματικών ψεκασμών επιφανειών εσωτερικών χώρων (Indoor residual spray, IRS). Οι εφαρμογές αυτές, από το 2000 έχουν μειώσει στο ήμισυ τους θανάτους και πάνω από 30% τα περιστατικά της ελονοσίας (Bhatt et al., 2015; WHO, 2014). Όμως, για πάνω από μία δεκαετία, οι μέθοδοι αυτές εφαρμόζονταν σε ένα πολύ μεγάλο ποσοστό αποκλειστικά με πυρεθροειδή εντομοκτόνα, τα οποία είναι ούτως ή άλλως τα μοναδικά που επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται στα LLINs, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ανθεκτικότητας σε αυτά. Την τελευταία δεκαετία, η ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα έχει διαδοθεί στο μεγαλύτερο μέρος της αφρικανικής ηπείρου (Ranson and Lissenden, 2016).

Επιπροσθέτως, η ανθεκτικότητα έχει επίσης εμφανιστεί και στις άλλες ομάδες εντομοκτόνων που χρησιμοποιούνται, όπως τα καρβαμιδικά, τα οργανοχλωριωμένα και σε μικρότερη κλίμακα στα οργανοφωσφορικά (Εικόνα 4.1). Ιδιαίτερη ανησυχία μάλιστα, προκαλούν πληθυσμοί που έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα και στις τέσσερις αυτές κλάσεις εντομοκτόνων, όπως είναι αυτοί από το Μάλι και την Ακτή Ελεφαντοστού (Ranson and Lissenden, 2016).



**Εικόνα 4.1:** Εξάπλωση της ανθεκτικότητας στις τέσσερις ομάδες εντομοκτόνων στον κύριο φορέα της ελονοσίας, *An. gambiae*, στην Αφρική από το 2001 έως το 2012. Οι πράσινες κουκίδες αντιπροσωπεύουν την ευαισθησία, οι πορτοκαλί την πιθανή ανθεκτικότητα και οι κόκκινες την επιβεβαιωμένη ανθεκτικότητα. (Πηγή: (Soko et al., 2015))

Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα στους φορείς της ελονοσίας περιλαμβάνουν όλους τους τύπους ανθεκτικότητας. Από τις περιπτώσεις ανθεκτικότητας στόχου, η πιο κοινή μεταλλαγή στη θέση 1014 στο γονίδιο που κωδικοποιεί για το κανάλι νατρίου (Voltage-gated Sodium Channel, VGSC gene) που έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση της λευκίνης με φαινυλαλανίνη ή σερίνη (L1014F/S), σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα (Martinez-Torres et al., 1998; Ranson et al., 2000). Μία μεταλλαγή στη θέση 119 του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης, που οδηγεί σε αντικατάσταση της γλυκίνης σε σερίνη (G119S) σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά εντομοκτόνα (Weill et al., 2003). Τέλος, μία μεταλλαγή στη θέση 296 του υποδοχέα

του γ-αμινοβουτυρικού οξέος που ευθύνεται για την αντικατάσταση της αλανίνης σε σερίνη, συνδέεται με την ανθεκτικότητα στα κυκλοδιένια (οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα) (Du et al., 2005).

Πολύ κοινός επίσης μηχανισμός είναι η υπερέκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα αποτοξικοποίησης (μεταβολική ανθεκτικότητα). Από τις οικογένειες των P450 γονιδίων που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα, η οικογένεια των CYP6 κυριαρχεί στα κουνούπια. Στο *An. gambiae* η CYP6P3 και CYP6M2 μεταβολίζουν τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα, ενώ η πρώτη και τα οργανοφωσφορικά (Adolfi et al., 2019; Müller et al., 2008; Stevenson et al., 2011). Επιπλέον, η CYP6Z1 σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή και το DDT (Chiu et al. 2008), και η CYP6P4 με την ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή (Haruna et al. 2020). Επίσης η CYP9K1 της οικογένειας των CYP9 P450 οξειδασών έχει πρόσφατα δειχθεί να μεταβολίζει πυρεθροειδή εντομοκτόνα (Vontas et al., 2018). Οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης έχουν συνδεθεί με ανθεκτικότητα στο DDT, αλλά και με πυρεθροειδή εντομοκτόνα. Η GSTE2 συγκεκριμένα σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα και στο DDT (Adolfi et al., 2019). Τέλος, αυξημένη δραστηριότητα εστερασών έχει βρεθεί σε πληθυσμούς *An. gambiae* ανθεκτικούς σε οργανοφωσφορικά και πυρεθροειδή εντομοκτόνα (Vulule et al., 1999).

Με βάση τα όσα προαναφέρθηκαν, οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας στόχου και η μεταβολική ανθεκτικότητα έχουν μελετηθεί αρκετά στον κύριο φορέα της ελονοσίας *An. gambiae*. Παρ' όλα αυτά, η εμφάνιση πολύ έντονων φαινοτύπων ανθεκτικότητας στη Δυτική Αφρική, όπου πληθυσμοί κουνουπιών πολύ ανθεκτικοί στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα, εμφανίζουν επίσης ανθεκτικότητα σε άλλες ομάδες εντομοκτόνων (ανασκόπηση από Hemingway et al., 2016; Ranson and Lissenden, 2016), υποδεικνύουν την ανάκυψη και επιπρόσθετων, διευρυμένου φάσματος μηχανισμών.

Το επιδερμίδιο (cuticle) έχει προταθεί ότι παίζει ρόλο στην ανθεκτικότητα μέσω τροποποιήσεων που μειώνουν ή καθυστερούν τη διείσδυση των εντομοκτόνων, με διάφορες μελέτες σε έντομα γεωργικής σημασίας να υποστηρίζουν αυτή την υπόθεση (Ahmad et al., 2006; Gunning et al., 1994; Lin et al., 2012). Το πάχος του επιδερμιδίου, το περιεχόμενό του σε υδρογονάνθρακες (Hydrocarbons, HCs), και η μειωμένη διείσδυση του εντομοκτόνου deltamethrin έχουν σχετισθεί με υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα στο είδος *Triatoma infestans*, τον φορέα της ασθένειας Chagas στην Αμερική (Juárez et al., 2010; Pedrini et al., 2009), και η ανθεκτικότητα επιδερμιδίου έχει περιγραφεί σε ανθεκτικό στο DDT πληθυσμό της μύγας *D. melanogaster* (Strycharz et al., 2013).

Ανθεκτικότητα του επιδερμιδίου έχει αναφερθεί και στα κουνούπια, όμως τα δεδομένα περιορίζονται σε μία μόνο μελέτη, στην οποία το αυξημένο πάχος του επιδερμιδίου έχει σχετισθεί με την ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα στο *Anopheles funestus* (Wood et al., 2010). Όμως, υπάρχουν μελέτες με αναλύσεις μεταγραφώματος, που δείχνουν αυξημένη έκφραση διάφορων γονιδίων του επιδερμιδίου σε ανθεκτικούς πληθυσμούς του γένους *Anopheles* και *Aedes* (Gregory et al., 2011; Jones et al., 2013; Vontas et al., 2007). Επιπλέον, γονίδια που πιθανόν εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των λιπιδίων και στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων έχουν σχετισθεί με φαινοτύπους ανθεκτικότητας στο *An. gambiae* και στο *An. arabiensis* (Jones et al., 2013; Τοέ et al., 2015).

Τα πόδια των κουνουπιών έχουν πολύ κεντρικό ρόλο στη ζωή των κουνουπιών. Έχουν προσαρμοστεί να εξυπηρετούν λειτουργίες όπως το περπάτημα στην επιφάνεια του νερού, σε κάθετες επιφάνειες και ταβάνια καθώς και την ανίχνευση χημικών ή μηχανικών ερεθισμάτων (Wu et al., 2007). Το εξώτατο μέρος των ποδιών των κουνουπιών είναι το επιδερμίδιο, το οποίο συνεισφέρει σε ποικίλες λειτουργίες όπως προστασία από αφυδάτωση, χημική επικοινωνία και αισθητήρια αντίληψη του περιβάλλοντος, μηχανική στήριξη και κίνηση. Το επιδερμίδιο των ποδιών είναι επίσης το πρώτο φράγμα προστασίας του εντόμου από την είσοδο ξενοβιοτικών, όπως τα εντομοκτόνα (Norrun et al., 1989).

Στην επιφάνεια του επιδερμιδίου οι HCs σχηματίζουν μία ισχυρά αδιάβροχη στρώση, η οποία προσφέρει ανθεκτικότητα στην αφυδάτωση (Gibbs, 1998; Howard and Blomquist, 2005; Rouault et al., 2004). Επιπλέον, η σύσταση/μείγμα των επιδερμικών HCs είναι χαρακτηριστική για διαφορετικά είδη εντόμων, ενώ μέσα στο ίδιο είδος, η σύσταση των HCs μπορεί να ποικίλει ποσοτικά, ανάλογα τη γεωγραφική προέλευση του πληθυσμού (Calderón-Fernández et al., 2012), να χαρακτηρίζει την ηλικία ή το φύλο (Caruto et al., 2005; Snellings et al., 2018; Zhang et al., 2014), καθώς επίσης και να παίζει διπλό ρόλο στην ανθεκτικότητα στην αφυδάτωση και στη φερομονική επικοινωνία (Chung and Carroll, 2015).

Το παρόν κεφάλαιο αποτελεί μέρος μίας εκτενέστερης μελέτης που αφορά τη διερεύνηση του μηχανισμού της ανθεκτικότητας διείσδυσης στον φορέα της ελονοσίας *Anopheles gambiae*, η οποία περιλαμβάνει την ανάλυση των εμποδίων της εισόδου του εντομοκτόνου μέσω του επιδερμιδίου. Πιο συγκεκριμένα, έγινε σύγκριση του ρυθμού εισόδου ραδιο-σημασμένου εντομοκτόνου και μελετήθηκαν οι ποσοτικές τροποποιήσεις της σύστασης του επιδερμιδίου σε ανθεκτικά και ευαίσθητα κουνούπια.

## 4. 2 Υλικά και μέθοδοι

### 4.2.1 Πληθυσμοί κουνουπιών *Anopheles gambiae*

Για τη διεξαγωγή των πειραματικών διαδικασιών του παρόντος κεφαλαίου χρησιμοποιήθηκαν ένας ευαίσθητος και δύο ανθεκτικοί στα εντομοκτόνα πληθυσμοί. Ο πληθυσμός N'Goussou από το Καμερούν, ο οποίος είναι ευαίσθητος σε όλα τα εντομοκτόνα και ο πληθυσμός Tiassale τα νότια της Ακτής Ελεφαντοστού, ο οποίος είναι ανθεκτικός σε όλα τα εντομοκτόνα, χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα υπολογισμού του ρυθμού διείσδυσης της δραστικής ουσίας deltamethrin και στην ποσοτικοποίηση των υδρογονανθράκων του επιδερμιδίου. Ο ευαίσθητος πληθυσμός N'Goussou και ο πληθυσμός VK7 από την Μπουρκίνα Φάσο ο οποίος είναι ανθεκτικός κυρίως στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα και στο DDT (Toe et al. 2015), χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση επιδερμικών υδρογονανθράκων ποδιών και ολόκληρου σώματος. Η εκτροφή των κουνουπιών πραγματοποιήθηκε κάτω από σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας 27 °C, υγρασίας 70-80% και φωτοπεριόδου 12:12 ώρες φως:σκοτάδι. Και οι δύο πληθυσμοί διατηρήθηκαν για αρκετό χρονικό διάστημα (πάνω από δύο γενεές) στις ίδιες σταθερές συνθήκες πριν χρησιμοποιηθούν στις αναλύσεις.

### 4.2.2 Υπολογισμός ρυθμού διείσδυσης του ραδιοσημασμένου εντομοκτόνου <sup>14</sup>C deltamethrin

Περίπου 30-35 ενήλικα θηλυκά κουνούπια από κάθε πληθυσμό (N'Goussou και Tiassale) εκτέθηκαν για 3 min σε εμποτισμένο με ραδιοσημασμένο 0,01% deltamethrin (παραχωρήθηκε από τον Ralf Nauen, Bayer CropScience, Monheim am Rhein, Germany) χαρτί, βάσει του τυπικού πρωτοκόλλου βιοδοκιμής του ΠΟΥ (WHO, 1998). Συνοπτικά, το πρωτόκολλο περιλαμβάνει την έκθεση 20-25 ενήλικων κουνουπιών σε πλαστικό κυλινδρικό δοχείο το οποίο περιέχει χαρτί εμποτισμένο με εντομοκτόνο. Μετά το πέρας του χρόνου έκθεσης, τα κουνούπια μεταφέρονται σε δεύτερο πλαστικό κυλινδρικό δοχείο το οποίο περιέχει χαρτί χωρίς εντομοκτόνο και αφήνονται εκεί για την καταγραφή της θνησιμότητας. Στη δική μας περίπτωση, μετά το πέρας του χρόνου έκθεσης, τα κουνούπια συλλέχθηκαν από το δεύτερο πλαστικό κυλινδρικό δοχείο.



Ακολούθησαν 3 εκπλύσεις με 1 ml εξάνιο (hexane), οι οποίες αποθηκεύονταν σε γυάλινο δοχείο. Κατόπιν, ακολούθησε στέγνωμα των κουνουπιών και ομογενοποίησή τους σε 500 ul PBS (Phosphate buffer saline: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων). Στη συνέχεια, 10 ml Scintillation Counting Mixture (Ultima Gold, 6013326, PerkinElmer) προστέθηκαν σε κάθε δείγμα, και οι αντίστοιχες κρούσεις μετρήθηκαν στη συνέχεια σε μετρητή β- ακτινοβολίας (LS1701; Beckman). Ο ρυθμός διείσδυσης (Penetration rate, PR) υπολογίστηκε από τον λόγο του αριθμού των κρούσεων ανά λεπτό στο εσωτερικό του σώματος των κουνουπιών (κρούσεις που μετρήθηκαν μετά την ομογενοποίηση των κουνουπιών σε PBS) προς τον αριθμό των συνολικών (κρούσεις που μετρήθηκαν από όλο το σώμα, δηλαδή στα αρχικά ξεπλύματα με εξάνιο και στα ομογενοποιημένα σε PBS κουνούπια) κρούσεων ανά λεπτό.

### **4.2.3 Απομόνωση λιπιδίων των κουνουπιών**

Τα επιδερμικά λιπίδια απομονώθηκαν από ενήλικα κουνούπια, ηλικίας 3-5 ημερών. Τα θηλυκά κουνούπια που χρησιμοποιήθηκαν δεν είχαν προηγουμένως λάβει γεύμα αίματος. Τα λιπίδια απομονώθηκαν με εμβάπτιση σε εξάνιο, τρεις φορές, με ελαφριά ανάδευση και στο τέλος τα 3 εκχυλίσματα ενώθηκαν.

Στην πρώτη μελέτη που διεξήχθη (Balabanidou et al., 2016), η απομόνωση των επιδερμικών λιπιδίων πραγματοποιήθηκε από ολόκληρα θηλυκά κουνούπια από τους πληθυσμούς N'Gusso (ευαίσθητα) και Tiassale (ανθεκτικά). Πραγματοποιήθηκαν 4 επαναλήψεις από 20 άτομα για τον ευαίσθητο πληθυσμό και 5 επαναλήψεις από 20 άτομα για τον ανθεκτικό πληθυσμό. Επιπλέον, απομονώθηκαν τα εσωτερικά λιπίδια από τα ίδια δείγματα, μετά από εμβάπτιση σε 2,5 ml εξάνιο για 24 h και μία τελική πλύση με 2 ml εξάνιο. Τα συνολικά λιπίδια εξάχθηκαν με την ίδια μέθοδο, χωρίς να προηγηθεί η εξαγωγή των επιδερμικών λιπιδίων. Συνολικά λιπίδια εξάχθηκαν από 100 ενήλικα θηλυκά άτομα του ευαίσθητου πληθυσμού.

Στην επόμενη μελέτη (Balabanidou et al., 2019), η απομόνωση των επιδερμικών λιπιδίων πραγματοποιήθηκε από ολόκληρα θηλυκά και αρσενικά κουνούπια από τους πληθυσμούς N'Gusso (ευαίσθητα) και VK7 (ανθεκτικά). Απομόνωσή λιπιδίων πραγματοποιήθηκε επίσης, και από τα πόδια των κουνουπιών. Τα κουνούπια κατηγοριοποιήθηκαν σε θηλυκά ανθεκτικά (ΘΑ), αρσενικά ανθεκτικά (ΑΑ), θηλυκά ευαίσθητα (ΘΕ) και αρσενικά ευαίσθητα (ΑΕ). Στην περίπτωση των ολόκληρων κουνουπιών, πραγματοποιήθηκαν 7 επαναλήψεις από 10 κουνούπια η κάθε μία, ενώ

στην περίπτωση των ποδιών έγιναν 7 επαναλήψεις με 60 πόδια ανά επανάληψη, για κάθε ομάδα κουνουπιών. Τα κουνούπια που χρησιμοποιήθηκαν στις 7 επαναλήψεις συλλέχθηκαν από 3 συνεχόμενες γενιές του κάθε πληθυσμού.

Σε όλες τις περιπτώσεις τα εκχυλίσματα συγκεντρώθηκαν με την εξάτμιση του οργανικού διαλύτη σε ατμόσφαιρα αέριου N<sub>2</sub>.

Σε όλες τις περιπτώσεις, τα εκχυλίσματα λιπιδίων υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία προσρόφησης για το διαχωρισμό των υδρογονανθράκων (Hydrocarbons, HCs) από τις λοιπές προσμίξεις (κυρίως λιπαρά οξέα, αλκοόλες και άλλα λίπη), ενώ οι υδατάνθρακες στη συνέχεια παραγωγοποιήθηκαν. Ακολούθως, οι HCs αναλύθηκαν σε αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (Gass Chromatography-Flame Ionization Detector, GC-FID) και αέρια χρωματογραφία με φασματοφωτομετρία μάζας (Gass Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS) ανάλυση για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό τους. Όλες οι αναλύσεις διαχωρισμού, παραγωγοποίησης και προσδιορισμού πραγματοποιήθηκαν από τους Dr M Patricia Juárez και Sergio J. Mijailovsky (Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata, Centro Científico Tecnológico La Plata, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas—Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata 1900, Argentina). Επίσης, ένα μέρος των απομονώσεων των λιπιδίων πραγματοποιήθηκε από τους ίδιους συνεργάτες λόγω ύπαρξης προβλημάτων επιμολύνσεων στο εργαστήριό μας.

## 4.3 Αποτελέσματα

### 4.3.1 Ρυθμός διείσδυσης του εντομοκτόνου deltamethrin

Ο ρυθμός διείσδυσης του εντομοκτόνου deltamethrin υπολογίστηκε σε κουνούπια από τους πληθυσμούς N'Goussou και Tiassale μετά την έκθεσή τους στο ραδιοσημασμένο <sup>14</sup>C deltamethrin. Με βάση τη σύγκριση των λόγων του ραδιοσημασμένου <sup>14</sup>C που μετρήθηκε στο εσωτερικό του σώματος των κουνουπιών προς το συνολικό <sup>14</sup>C που μετρήθηκε από ολόκληρο το σώμα (εξωτερικά και εσωτερικά), στη μονάδα του χρόνου, παρατηρήθηκε μείωση του ρυθμού εισόδου του

εντομοκτόνου κατά ~50% στα ανθεκτικά κουνούπια (Tiassale) σε σχέση με τα ευαίσθητα (N' Gusso) (Πίνακας 4.1).

**Πίνακας 4.1: Ρυθμός διείσδυσης του  $^{14}\text{C}$  deltamethrin στα ευαίσθητα και ανθεκτικά *An. gambiae*.**

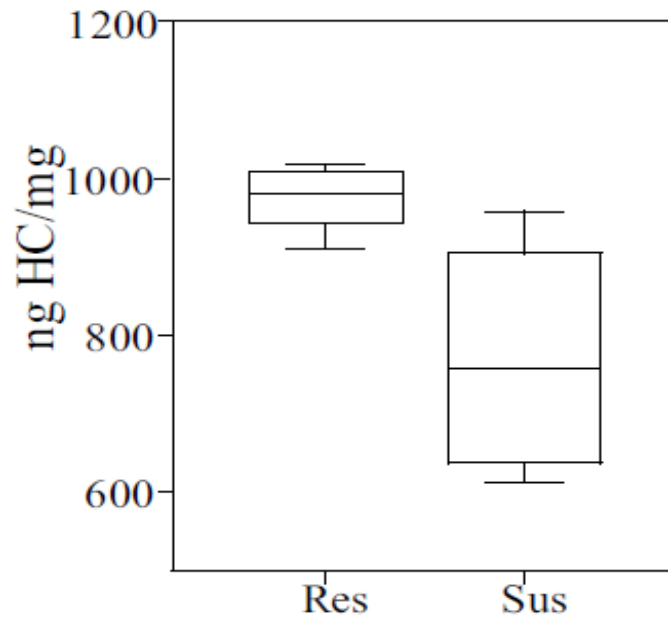
Πληθυσμός	Ρυθμός Διείσδυσης, $10^{-3}$ (Τυπική απόκλιση)	Ratio $PR_{Sus}/PR_{Res}$
Susceptible (N' Gusso)	60 ( $\pm 14$ )	2,06
Resistant (Tiassale)	29 ( $\pm 8$ )	

## 4.3.2 Ανάλυση υδρογονανθράκων

### 4.3.2.1 Ανάλυση συνολικών και επιδερμικών υδρογονανθράκων

Η ανάλυση των υδρογονανθράκων του επιδερμιδίου (Cuticular Hydrocarbons, CHCs) και των συνολικών υδρογονανθράκων (Total Hydrocarbons, THCs) με GC-FID και GC-MS έδειξε πανομοιότυπα προφίλ των HCs μεταξύ του ευαίσθητου (N'Gusso) και ανθεκτικού (Tiassale) πληθυσμού, με τους CHCs να αντιπροσωπεύουν το  $85,38 \pm 0,99\%$  των THCs στον ανθεκτικά και το  $81,91 \pm 2,84\%$  στον ευαίσθητα θηλυκά άτομα.

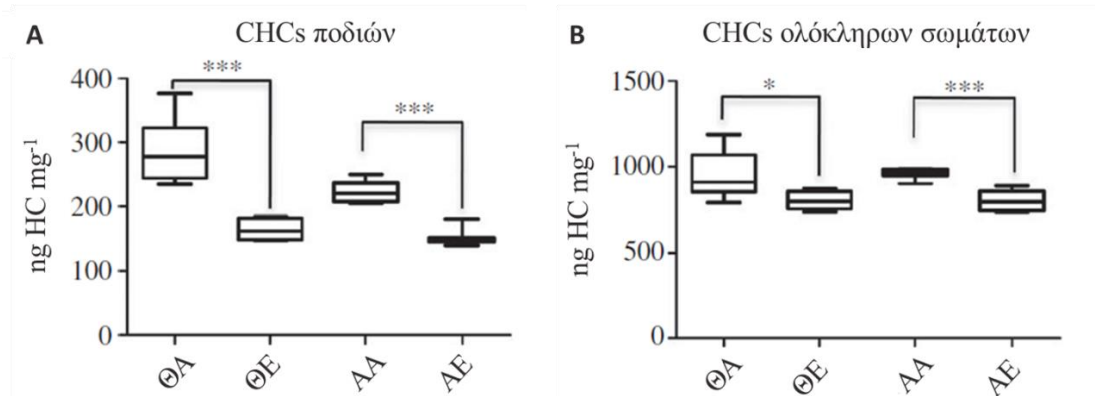
Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των CHCs του ανθεκτικού (Tiassale) και ευαίσθητου (N'Gusso) πληθυσμού (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία) η οποία δεν έδειξε κάποια ποιοτική διαφορά μεταξύ τους, όμως τα ανθεκτικά θηλυκά κουνούπια φάνηκε να περιέχουν σημαντικά υψηλότερα ποσά (~29%) CHCs σε σχέση με τα ευαίσθητα ( $980,5 \pm 18,6$  ng CHCs  $\text{mg}^{-1}$  κουνουπιού και  $757,5 \pm 72,5$  ng CHCs  $\text{mg}^{-1}$  κουνουπιού, αντίστοιχα) (Εικόνα 4.2).



**Εικόνα 4.2: Σύγκριση των CHCs σε ανθεκτικά (Res) και ευαίσθητα (Sus) θηλυκά κουνούπια.** Οι CHCs ποσοτικοποιήθηκαν με GC-MS/FID (20 κουνούπια/δείγμα) και βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά υψηλότεροι στα ανθεκτικά σε σχέση με τα ευαίσθητα κουνούπια. Το θηκόγραμμα (boxplot) δείχνει το 25° και το 75° εκατοστιαίο σημείο, η διάμεσος είναι η μαύρη γραμμή μέσα στο κουτί και οι μύστακες (whiskers) αντιστοιχούν στο 10° και στο 90° εκατοστιαίο σημείο.

#### 4.3.2.2 Ανάλυση επιδερμικών υδρογονανθράκων ποδιών και ολόκληρου σώματος

Στην επόμενη μελέτη προχωρήσαμε περαιτέρω στη διαλεύκανση του μηχανισμού, εστιάζοντας αυτή την φορά στα πόδια των κουνουπιών. Η ανάλυση των CHCs στα πόδια έδειξε ότι τα θηλυκά ανθεκτικά (VK7) κουνούπια είχαν 43,15% περισσότερους CHCs σε σχέση με τα ευαίσθητα (μέσα επίπεδα CHCs:  $286,77 \pm 48,74 \text{ ng mg}^{-1}$  και  $163,03 \pm 15,70 \text{ ng mg}^{-1}$  ποδιών, αντίστοιχα) (Εικόνα 4.3 A). Στα αρσενικά ανθεκτικά κουνούπια, τα επίπεδα των CHCs στα πόδια ήταν 32,31% υψηλότερα σε σχέση με τα ευαίσθητα (μέσα επίπεδα CHCs:  $224,46 \pm 17,01 \text{ ng mg}^{-1}$  και  $151,93 \pm 13,44 \text{ ng mg}^{-1}$  ποδιών αντίστοιχα) (Εικόνα 4.3 A). Η ανάλυση των CHCs από ολόκληρα κουνούπια έδειξε ότι τα ανθεκτικά (VK7) θηλυκά κουνούπια είχαν 16,37% περισσότερους συνολικούς CHCs από τα ευαίσθητα (μέσα επίπεδα CHCs:  $964,98 \pm 134,42 \text{ ng mg}^{-1}$  και  $806,97 \pm 53,12 \text{ ng mg}^{-1}$  κουνουπιού, αντίστοιχα) (Εικόνα 4.3 B). Αυτή η διαφορά ήταν παρόμοια και στα αρσενικά κουνούπια (16,67%, μέσα επίπεδα CHCs:  $965,91 \pm 28,43 \text{ ng mg}^{-1}$  και  $804,9 \pm 57,41 \text{ ng mg}^{-1}$ , αντίστοιχα) (Εικόνα 4.3 B)



**Εικόνα 4.3: Ποσοτικοποίηση των CHCs σε κουνούπια *Anopheles gambiae*.** Α. Ποσοτική ανάλυση των CHCs από τα πόδια ανθεκτικών θηλυκών και αρσενικών κουνουπιών, σε σχέση με τα ευαίσθητα. Β. Ποσοτική ανάλυση των CHCs από ολόκληρα σώματα ανθεκτικών θηλυκών και αρσενικών κουνουπιών, σε σχέση με τα ευαίσθητα. ΘΑ: θηλυκά ανθεκτικά, ΘΕ: θηλυκά ευαίσθητα, ΑΑ: αρσενικά ανθεκτικά και ΑΕ: αρσενικά ευαίσθητα. Τα δεδομένα παρουσιάζονται θηκόγραμμα (boxplot) που δείχνει το 25<sup>ο</sup> και το 75<sup>ο</sup> εκατοστιαίο σημείο, η διάμεσος είναι η μαύρη γραμμή μέσα στο κουτί και οι μύστακες (whiskers) αντιστοιχούν στο 10<sup>ο</sup> και στο 90<sup>ο</sup> εκατοστιαίο σημείο. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0,05$ ), \*\*\* Στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0,001$ )

Αξιοσημείωτα, το 29,66% των συνολικών CHCs των θηλυκών ανθεκτικών κουνουπιών βρέθηκαν στα πόδια, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό CHCs στα πόδια των θηλυκών ευαίσθητων κουνουπιών ήταν 20,17%. Τα ανάλογα ποσοστά που σημειώθηκαν στα πόδια των ανθεκτικών και ευαίσθητων αρσενικών κουνουπιών ήταν 23,28% και 18,98% επί των συνολικών CHCs αντίστοιχα. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι τα ανθεκτικά κουνούπια διαθέτουν μεγαλύτερη αφθονία σε HCs του επιδερμιδίου, και ιδιαίτερα στα πόδια τους.

## 4.3 Συζήτηση

Οι ασθένειες που μεταδίδονται από κουνούπια αποτελούν ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα που αντιμετωπίζει η ανθρωπότητα σήμερα, καθώς πλήττουν πάνω από τρία δισεκατομμύρια ανθρώπους κάθε χρόνο, με τεράστιες κοινωνικοοικονομικές επιπτώσεις. Οι ροές πληθυσμών και το προσφυγικό πρόβλημα της εποχής, το εμπόριο και η κλιματική αλλαγή είναι πιθανόν να φέρουν τη χώρα μας και την Ευρώπη αντιμέτωπη με πρωτόγνωρες καταστάσεις επανεμφάνισης ασθενειών, όπως η

ελονοσία. Είδη του γένους *Anopheles* που αποτελούν φορείς της ελονοσίας είναι ευρέως διαδεδομένα και στον Ελληνικό χώρο.

Ο αποτελεσματικότερος τρόπος καταπολέμησης των ασθενειών που μεταδίδονται από κουνούπια παραμένει η χρήση εντομοκτόνων για την μείωση του πληθυσμού των κουνουπιών-φορέων (Bhatt et al., 2015). Παρόλα αυτά, τα διαθέσιμα εντομοκτόνα είναι περιορισμένα. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την εκτεταμένη και συχνά αλόγιστη χρήση τους, τόσο στον τομέα της δημόσιας υγείας όσο και σε αυτόν της γεωργίας, έχει οδηγήσει στην επιλογή πληθυσμών με ανθεκτικότητα. Το πρόβλημα της ανθεκτικότητας είναι η μεγαλύτερη πρόκληση που αντιμετωπίζει σήμερα ο Π.Ο.Υ, στην προσπάθειά του για τον έλεγχο των εντομο-μεταδιδόμενων ασθενειών.

Για την αντιμετώπιση και διαχείριση του φαινομένου της ανθεκτικότητας απαραίτητη προϋπόθεση είναι η πολύ καλή γνώση του μοριακού της υπόβαθρου. Πολλές έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί προς την κατεύθυνση αυτή αναδεικνύοντας την υπερέκφραση διαφόρων ενζύμων αποτοξικοποίησης αλλά και την παρουσία μεταλλαγών στον στόχο των εντομοκτόνων ως μηχανισμούς ανθεκτικότητας (ανασκόπηση από Hemingway et al., 2004). Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, η οποία αποτελεί μέρος μίας πιο εκτεταμένης ανάλυσης που έχει διεξαχθεί, εστίασαμε στη διερεύνηση του μηχανισμού της ανθεκτικότητας διείσδυσης (Balabanidou et al., 2019, 2016).

Είναι πλέον γνωστό πως μέσω της καταλυτικής δράσης ενζύμων P450 της οικογένειας 4G που εκφράζονται κάτω ακριβώς από την επιδερμίδα του εξωσκελετού (στα οινोकύτταρα, oenocytes), γίνεται η παραγωγή των υδρογονανθράκων, οι οποίοι μεταφέρονται και τελικά συσσωρεύονται στην ανώτερη στοιβάδα του εξωσκελετού (επιδερμίδιο, epicuticle) (Kefi et al., 2019). Στο πλαίσιο της εργασίας αυτής το βασικό ερώτημα που τέθηκε, ήταν κατά πόσο συνεισφέρει πραγματικά στο φαινόμενο της ανθεκτικότητας η ενίσχυση του λιπώδους στρώματος υδρογονανθράκων του εξωσκελετού σε ολόκληρα έντομα αρχικά, αλλά τελικά και στα πόδια των κουνουπιών, ως του πιο σχετικού μέρους του σώματος, μέσω του οποίου θα εισέλθουν τα εντομοκτόνα επαφής.

Προς την κατεύθυνση αυτή, μετρήθηκε αρχικά ο ρυθμός εισόδου του εντομοκτόνου επαφής deltamethrin σε έναν πολλαπλώς ανθεκτικό πληθυσμό κουνουπιών *Anopheles gambiae* (Tiassale). Βρέθηκε πως τα κουνούπια αυτά εσωτερικευαν το ραδιοσημασμένο εντομοκτόνο πιο αργά σε σχέση με τα αντίστοιχα εργαστηριακά ευαίσθητα κουνούπια, καταδεικνύοντας για πρώτη φορά πως ο μειωμένος ρυθμός εισόδου του σημασμένου εντομοκτόνου <sup>14</sup>C deltamethrin σε ανθεκτικό πληθυσμό *Anopheles gambiae*, ο οποίος σχετίζεται με πιθανή τροποποίηση του επιδερμιδίου,

μπορεί να επηρεάζει τη διείσδυση του εντομοκτόνου. Ομοίως, μειωμένη είσοδος του deltamethrin παρατηρήθηκε σε έναν ανθεκτικό πληθυσμό *Triatoma infestans* (Juárez et al., 2010), στον οποίο η αφαίρεση της επιδερμικής λιπιδικής στοιβάδας με διαλύτες σχετίστηκε με ενισχυμένη διείσδυση του εντομοκτόνου και θνησιμότητα του εντόμου (Juárez, 1994).

Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των υδρογονανθράκων του επιδερμιδίου των δύο παραπάνω πληθυσμών (ανθεκτικός και ευαίσθητος εργαστηριακός πληθυσμός) και βρήκαμε πως τα ανθεκτικά κουνούπια περιέχουν στατιστικώς σημαντικά περισσότερους υδρογονάνθρακες σε σχέση με τα αντίστοιχα ευαίσθητα. Προχωρώντας περαιτέρω, πραγματοποιήσαμε ποσοτική ανάλυση των CHCs των ποδιών των κουνουπιών και ενός δεύτερου πληθυσμού ανθεκτικών κουνουπιών, των VK7. Από την ανάλυση αυτή φάνηκε ότι τα πόδια των ανθεκτικών κουνουπιών (VK7) έφεραν σημαντικά περισσότερους CHCs (43,15% στα θηλυκά και 32,31% στα αρσενικά άτομα) σε σχέση με αυτά των ευαίσθητων (N'Gusso), γεγονός το οποίο συμφωνεί με τις διαφορές που παρατηρήθηκαν στα ολόκληρα σώματα των ίδιων πληθυσμών (~16,37% περισσότεροι στα ανθεκτικά θηλυκά και 16,67% στα αντίστοιχα αρσενικά άτομα σε σχέση με τα ευαίσθητα άτομα), οι οποίες όμως ήταν σαφώς μειωμένες.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω ευρήματα, καταλήγουμε πως δημιουργείται ένα παχύτερο λιπόφιλο στρώμα υδρογονανθράκων στα πόδια των ανθεκτικών κουνουπιών, το οποίο μειώνει τη διαπερατότητα του επιδερμιδίου και μειώνει ή καθυστερεί την είσοδο των υδρόφοβων μορίων του εντομοκτόνου στο σώμα του εντόμου. Δίνεται με τον τρόπο αυτό, ο απαραίτητος επιπλέον χρόνος στα ένζυμα αποτοξικοποίησης να αδρανοποιήσουν τα εντομοκτόνα ώστε τελικά πολύ λιγότερα μόρια να προσεγγίζουν τον υποκυτταρικό τους στόχο στο νευρικό σύστημα. Θεωρούμε πως ο γενικός αυτός μηχανισμός άμυνας είναι δυνατόν να προκαλέσει εντυπωσιακά επίπεδα ανθεκτικότητας, σε ένα ευρύ φάσμα εντομοκτόνων.

Αυτό το εύρημα έρχεται να ενισχυθεί από το γεγονός ότι τα τελευταία χρόνια εντοπίζονται πλέον στην Αφρική πληθυσμοί κουνουπιών *Anopheles*, οι οποίοι είναι εξαιρετικά ανθεκτικοί σε όλα τα εντομοκτόνα και οι οποίοι υπερεκφράζουν σταθερά την 4G κυτοχρωμική οξειδάση (Edi et al., 2012; Müller et al., 2008; Toé et al., 2015). Χαρακτηριστικό των πολλαπλώς ανθεκτικών αυτών πληθυσμών κουνουπιών είναι πως διαθέτουν και επιπλέον αλλαγές έναντι των ευαίσθητων, όπως για παράδειγμα φέρουν τις μεταλλαγές kdr στο κανάλι νατρίου τους (Edi et al., 2012). Είναι λοιπόν εύλογο να θεωρηθεί πως η συνεξέλιξη πολλών μηχανισμών μπορεί να οδηγεί στα

υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας. Η διαλεύκανση των μηχανισμών αυτών σε μοριακό επίπεδο ή/και ακόμη πώς δύο ή και περισσότεροι μηχανισμοί μπορούν να δράσουν συνεργατικά μεταξύ τους κρίνεται πλέον αναγκαία για την εκτίμηση της κατάστασης της ανθεκτικότητας στο πεδίο όσο και την ολοκληρωμένη διαχείριση της.



## **Κεφάλαιο 5: Παρακολούθηση της πληθυσμιακής σύστασης, της δυναμικής και της ανθεκτικότητας σε πληθυσμούς κουνουπιών από την Κρήτη**

Αυτό το κεφάλαιο αναδιατυπώθηκε από μέρος του:

Fotakis, E.A., Mavridis, K., Kampouraki, A., Balaska, S., Tanti, F., Vlachos, G., Gewehr, S., Mourelatos, S., Papadakis, A., Kavalou, M., Nikolakakis, D., Moisaki, M., Kampanis, N., Loumpounis, M., Vontas, J., 2022, Mosquito population structure, pathogen surveillance and insecticide resistance monitoring in urban regions of Crete, Greece. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 16, e0010186, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010186>

## 5.1 Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια οι νότιες χώρες της Ευρώπης βιώνουν την επανεμφάνιση σημαντικών ασθενειών που μεταδίδονται από φορείς (vector borne diseases, VDB). Σε αυτό το επιδημιολογικό πλαίσιο, η Ελλάδα έχει αντιμετωπίσει εξάρσεις του ιού του Δυτικού Νείλου (NPHO, 2020a) και αρκετά περιστατικά ελονοσίας (NPHO, 2020b), τα οποία αποτελούν εν δυνάμει απειλή για τη δημόσια υγεία και κατ' επέκταση για τον τουρισμό της χώρας.

Η νότια Ευρώπη, περιλαμβάνει μία μεγάλη ποικιλομορφία ειδών κουνουπιών, εκ των οποίων αρκετά είδη είναι φορείς ασθενειών και η παρουσία τους αναφέρεται και στην Ελλάδα. Γνωστοί φορείς ασθενειών που αναφέρονται στην Ελλάδα περιλαμβάνουν τα είδη *Culex modestus* και *Culex pipiens* ss τα οποία είναι φορείς του ιού του Δυτικού Νείλου (EA Fotakis et al., 2020; Fotakis et al., 2017), το *Aedes albopictus* που είναι σημαντικός φορέας αρμπιοίων (Badieritakis et al., 2018; Balaska et al., 2020) και τους φορείς της ελονοσίας *Anopheles sacharovi* και *Anopheles superpictus*, όπως και τους δευτερεύοντες φορείς *Anopheles maculipennis* s.s., *Anopheles melanoon*, *Anopheles algeriensis*, *Anopheles clavinger*, *Anopheles hyrcanus* και *Anopheles plumbeus* (EA Fotakis et al., 2020; Fotakis et al., 2017; Linton et al., 2007; Robert et al., 2019).

Από τα είδη που αναφέρθηκαν παραπάνω, τα *Cx. pipiens*, *Ae. albopictus*, *An. clavinger* and *An. sacharovi* έχουν επίσης αναφερθεί και στην Κρήτη, μαζί με τα *Culex territans*, *Aedes caspius*, *Aedes cretinus*, *Aedes detritus*, *Aedes dorsalis*, *Culiseta longiareolata*, *Culiseta annulata* and *Culiseta sabochrea*, τα οποία αποτελούν είδη που προκαλούν όχληση (Patsoula et al., 2020; Robert et al., 2019). Παρ' όλα αυτά, οι πληροφορίες που αφορούν την πληθυσμιακή σύνθεση, την αφθονία και τη χωροχρονική δυναμική των ειδών αυτών, είναι πολύ λίγες.

Δεδομένης της απουσίας αποτελεσματικών εμβολίων κατά των VBDs και θεραπευτικών μέσων, η πρόληψη και ο έλεγχος των ασθενειών βασίζεται κυρίως στον έλεγχο των πληθυσμών των φορέων, κυρίως με τη χρήση εντομοκτόνων (Becker et al., 2010). Τα προνυμφοκτόνα *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) και diflubenzuron (DFB), και τα πυρεθροειδή που χρησιμοποιούνται κυρίως ως ακμαιοκτόνα, αποτελούν τα κύρια εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Bellini et al., 2014). Η εφαρμογή τους γίνεται κυρίως σε ευρεία κλίμακα, μέσω προγραμμάτων καταπολέμησης σε επίπεδο δήμου ή περιφερειακής ενότητας (ΠΕ). Οι ίδιες δραστικές

ουσίες πολλές φορές χρησιμοποιούνται και για την καταπολέμηση πολλών γεωργικών εχθρών (Reid and McKenzie, 2016).

Στην Ελλάδα, οι περισσότερες εφαρμογές γίνονται με σκευάσματα Bt και DFB, ενώ τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα χρησιμοποιούνται σε περιπτώσεις εξάρσεων ή/και περιπτώσεις αυξημένου επιδημιολογικού φορτίου (ΕΟΔΥ, 2018). Στην Κρήτη συγκεκριμένα, τα τοπικά προγράμματα κουνουποκτονίας βασίζονται κυρίως στη χρήση του DFB, ενώ σκευάσματα πυρεθροειδών εντομοκτόνων χρησιμοποιούνται εκτενώς σε προγράμματα καταπολέμησης του δάκου, *Bactrocera oleae* (σημαντικός γεωργικός εχθρός στην περιοχή). Σκευάσματα Bt χρησιμοποιούνται σε μικρότερη κλίμακα κατά των γεωργικών εχθρών, κυρίως σε βιολογικές καλλιέργειες.

Ένα σημαντικό πρόβλημα που προκύπτει από την έντονη και επανειλημμένη χρήση ενός περιορισμένου αριθμού διαθέσιμων δραστικών ουσιών για την καταπολέμηση των φορέων αλλά και των γεωργικών εχθρών στις νότιες ευρωπαϊκές χώρες, είναι η ανάπτυξη ανθεκτικότητας, η οποία υπονομεύει (σε διάφορα επίπεδα) την αποτελεσματικότητα των εφαρμογών καταπολέμησης. Όπως έχει αναφερθεί, η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα αποδίδεται από δύο (μεταξύ άλλων) κύριους μοριακούς μηχανισμούς. Την ανθεκτικότητα στόχου, και τη μεταβολική ανθεκτικότητα.

Οι μεταλλαγές I1043L, I1043M, I1043F, στο γονίδιο της συνθάσης της χιτίνης, που συνδέονται με τον εντυπωσιακό φαινότυπο της ανθεκτικότητας στο DFB, έχουν καταγραφεί σε πληθυσμούς *Cx. pipiens* από την Ιταλία (ΕΑ. Fotakis et al., 2020; Grigoraki et al., 2017; Porretta et al., 2019) και την Τουρκία (Guz et al., 2020) αλλά όχι σε πληθυσμούς *Cx. pipiens* και *Ae. albopictus* που έχουν ελεγχθεί από την Ελλάδα (Balaska et al., 2020; Porretta et al., 2019). Επιπλέον, οι μεταλλαγές L1014F/C/S και V1016G, F1534S/L/C, I1532T στο κανάλι νατρίου συνδέονται με την ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα στο *Cx. pipiens*, στα είδη του γένους *Anopheles* και στο *Ae. albopictus* αντίστοιχα.

Στο γονίδιο του καναλιού νατρίου, οι μεταλλαγές L1014F and L1014C έχουν καταγραφεί κατ' επανάληψη σε πληθυσμούς *Cx. pipiens* από την Ελλάδα, σε σχετικά υψηλές συχνότητες του ανθεκτικού αλληλομόρφου, που μερικές φορές ξεπερνάει το 50% (ΕΑ Fotakis et al., 2020; Fotakis et al., 2017; Kioulos et al., 2014; Mavridis et al., 2018a). Σε πληθυσμούς *Ae. albopictus* η μεταλλαγή F1534C έχει καταγραφεί σε διάφορους πληθυσμούς από την Ελλάδα, συμπεριλαμβανομένης της Κρήτης, με συχνότητα του ανθεκτικού αλληλομόρφου που ποικίλει από 6,2-68,3%, με έναν αριθμό πληθυσμών που επίσης φέρουν τη μεταλλαγή I1532T, αλλά όχι τη V1016G (Balaska et al., 2020).

Επιπροσθέτως, βάσει δοκιμών τοξικότητας, έχει αναφερθεί πιθανή παρουσία ανθεκτικότητας σε πληθυσμούς *Ae. caspius* και *An. hyrcanus* από τη βόρεια Ελλάδα (Fotakis et al., 2017), ανθεκτικότητα στο deltamethrin και στο temephos σε πληθυσμούς *Cx. ripiens* από τη βόρεια και κεντρική Ελλάδα (Fotakis et al., 2017; Κίουλος et al., 2014) και ανθεκτικότητα στο malathion σε πληθυσμούς *Ae. albopictus*, συμπεριλαμβανομένου και ενός πληθυσμού από την ΠΕ Ηρακλείου, στην Κρήτη (Balaska et al., 2020).

Τα ολοκληρωμένα συστήματα παρακολούθησης που περιλαμβάνουν εντομολογικά και επιδημιολογικά στοιχεία, αποτελούν βασικό υπόβαθρο για το σχεδιασμό και εφαρμογή αποτελεσματικών προγραμμάτων καταπολέμησης και πρόληψης. Πληροφορίες που αφορούν την πληθυσμιακή σύσταση των φορέων μίας περιοχής, η χωροχρονική δυναμική τους, η κατάσταση της ανθεκτικότητάς τους για διαφορετικές ομάδες εντομοκτόνων και η εποχιακή παρουσία παθογόνων στους φορείς και στους ξενιστές είναι σημαντικά δεδομένα που συντελούν στην εκτίμηση της πραγματικής κατάστασης ώστε οι επεμβάσεις καταπολέμησης να είναι άμεσες, στοχευμένες και αποδοτικές (Jourdain et al., 2019).

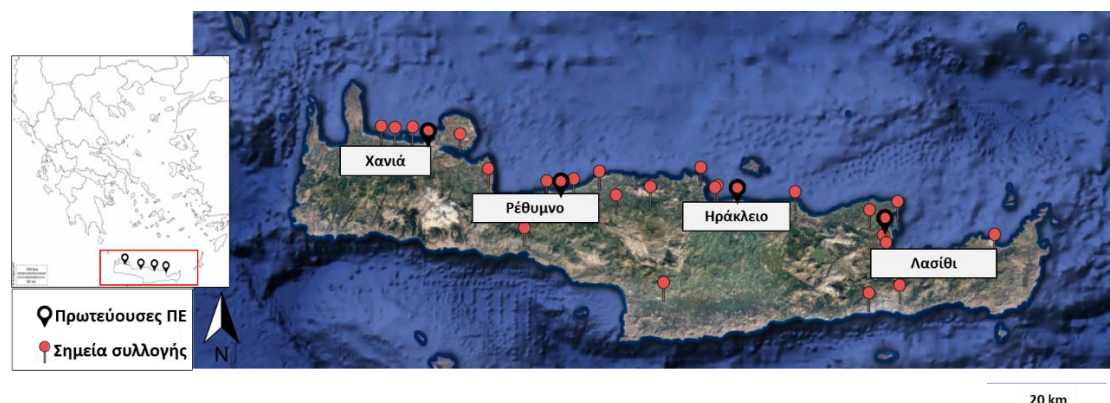
Παρά την παρουσία και τις εξάρσεις ασθενειών που μεταδίδονται από φορείς στην Ελλάδα, οι διαθέσιμες πληροφορίες και η παραγωγή εντομολογικών δεδομένων, καθώς και δεδομένων ανθεκτικότητας σε κάποιες περιοχές, όπως η Κρήτη, είναι ελλιπής και αποσπασματική. Υπό την αιγίδα της Περιφέρειας Κρήτης, ένα συστηματικό και ολοκληρωμένο δίκτυο παρακολούθησης των κουνουπιών και των παθογόνων που φέρουν δημιουργήθηκε για τα έτη 2018 έως 2020, ώστε τα προγράμματα καταπολέμησης των φορέων να υποστηρίζονται από τα παραγόμενα δεδομένα. Στην παρούσα μελέτη περιλαμβάνονται δεδομένα που αφορούν την παρακολούθηση της πληθυσμιακής σύστασης των ειδών και της δυναμικής τους στις 4 ΠΕ της Κρήτης και την κατάσταση της ανθεκτικότητας των πληθυσμών των φορέων.

## 5.2 Υλικά και μέθοδοι

### 5.2.1 Δείγματα κουνουπιών και μορφολογική αναγνώριση

Το πρόγραμμα παρακολούθησης είχε διάρκεια τριών ετών, από το 2018 έως το 2020, στην περιφέρεια της Κρήτης. Τα δείγματα κουνουπιών συλλέχθηκαν κατά τους μήνες Ιούνιο έως Δεκέμβριο το 2018 και κατά τους μήνες Απρίλιο έως Οκτώβριο το 2019 και 2020. Τα σημεία συλλογής των δειγμάτων περιλάμβαναν και τις 4 ΠΕ της Κρήτης, Χανιά, Ρέθυμνο, Ηράκλειο και Λασιθί, όπως φαίνονται στην Εικόνα 5.1.

Η τοποθέτηση των παγίδων και η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε από την Οικοανάπτυξη Α.Ε. (EcoDevelopment SA) στα πλαίσια του προγράμματος κουνουποκτονίας της Περιφέρειας Κρήτης. Η παραλαβή των δειγμάτων γινόταν ανά δύο εβδομάδες και αφού αναγνωρίζονταν μορφολογικά σε επίπεδο είδους αποθηκεύονταν στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  σε 70% αιθανόλη ώστε να χρησιμοποιηθούν αργότερα στις μοριακές αναλύσεις ταυτοποίησης είδους, και ανθεκτικότητας.



Εικόνα 5.1: Περιοχή μελέτης (νησί της Κρήτης), και τα σημεία συλλογής των δειγμάτων (κόκκινες πινέζες).

Η μορφολογική ταυτοποίηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με βάση τους Becker et al. 2010. Η πλειονότητα των δειγμάτων αναγνωρίστηκε σε επίπεδο είδους ή συμπλέγματος που ανήκουν, όμως υπήρχαν και αρκετά δείγματα που οι μορφολογικοί χαρακτήρες τους είχαν αλλοιωθεί και τακτοποιήθηκαν μόνο σε επίπεδο γένους. Όλα τα δείγματα κουνουπιών που τακτοποιήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σε περαιτέρω αναλύσεις ήταν θηλυκά.

## 5.2.2 Απομόνωση γενωματικού DNA και εφαρμογή μοριακών διαγνωστικών μεθόδων

Η απομόνωση του γενωματικού DNA πραγματοποιήθηκε με το πρωτόκολλο DNAzol, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Invitrogen). Κάθε δείγμα γενωματικού DNA προέρχονταν από ένα θηλυκό ενήλικο άτομο κουνουπιού.

Μετά την εξαγωγή του, το ολικό DNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα σε PCR αντιδράσεις για τη μοριακή ταυτοποίηση είδους με βάση μοριακούς δείκτες, και τη μοριακή ανίχνευση γνωστών μεταλλαγών ανθεκτικότητας. Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε η Kapa Taq DNA polymerase (Kapa Biosystems, Inc.), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Όλα τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης. Για όλα τα δείγματα που αλληλουχήθηκαν, προηγουμένως, τα PCR προϊόντα καθαρίστηκαν με Nucleospin PCR & Gel Clean-Up Kit (Macherey Nagel) και στη συνέχεια η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Sanger (CeMIA S.A., Larissa, Greece). Οι αλληλουχίες αναλύθηκαν με το λογισμικό BioEdit 7.2.5.

Η μοριακή ταυτοποίηση των δειγμάτων του συμπλέγματος *Culex pipiens* (*Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. pallens*, *Cx. australicus*, and *Cx. torrentium*), βασίζεται στην ύπαρξη πολυμορφισμών στο δεύτερο εσώνιο του γονιδίου ACE-2 (acetylcholinesterase-2) (Smith and Fonseca, 2004).

Μοριακή ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε επίσης για το διαχωρισμό των ειδών *Aedes albopictus*, *Ae. aegypti* και *Ae. cretinus*, με την ενίσχυση του γονιδίου ITS2 (internal transcribed spacer 2) (Patsoula et al., 2006).

Τέλος, μοριακά επίσης ταυτοποιήθηκαν τα είδη του γένους *Anopheles* με ενίσχυση μία μικρής περιοχής του γονιδίου ITS2 και του μιτοχονδριακού γονιδίου COI (cytochrome c oxidase I) (Collins and Paskewitz, 1996; Patsoula et al., 2007). Τα προϊόντα αλληλουχήθηκαν με τους εκκινητές 5.8S για το ITS2 και C1-J-1718 για το COI.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις μοριακής ταυτοποίησης, οι συνθήκες των αντιδράσεων και τα αναμενόμενα μεγέθη των προϊόντων δίνονται στον Πίνακα 5.1

Πίνακας 5.1: Εκκινητές, συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων και συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις μοριακής ταυτοποίησης είδους, και τα μεγέθη των αναμενόμενων προϊόντων.

	Εκκινητής	Αλληλουχία (5' → 3')	Αντίδραση PCR	Συνθήκες PCR αντίδρασης	Μέγεθος προϊόντος
Ταυτοποίηση είδους του <i>Cx pipiens</i> complex	ACEpip	GGAAACAACG ACGTATGTA CT	10-20 ng gDNA 0,5 μM of each primer 0,4 μM dNTPs 1X KAPA Taq Buffer A 0,15 mg/ml BSA 1 U of KAPA Taq pol	95 °C for 5 min, 40 cycles of [95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 1 min], 72 °C for 5 min	610 bp: <i>Cx. pipiens</i>
	ACEquin	CCTTCTTGAAT GGCTGTGGCA			274 bp: <i>Cx. quinquefasciatus</i>
	ACEpal	ATGGTGGAGA CGCATGACG			416 bp: <i>Cx. torrentium</i>
	ACEtorr	TGCCTGTGCT ACCAGTGATG TT			478 bp: <i>Cx. p. pallens</i>
	B1246s	TGGAGCCTCC TCTTCACGG			
Ταυτοποίηση είδους <i>Aedes</i>	5.8S	TGTGAACTGC AGGACACATG	10-20 ng gDNA 0,3-0,4 μM of each primer 0,4 μM dNTPs 1X KAPA Taq Buffer A 1,5 U of KAPA Taq pol	95 °C for 5 min, 40 cycles of [95 °C for 30 s, 52 °C for 30 s, 72 °C for 30 sec], 72 °C for 5 min	508 bp: <i>Ae. albopictus</i>
	28S	ATGCTTAAATT TAGGGGGTA			385 bp: <i>Ae. cretinus</i> 324 bp: <i>Ae. aegypti</i>
Ταυτοποίηση είδους <i>Anopheles</i>	5.8S		10-20 ng gDNA 0,3-0,4 μM of each primer 0,4 μM dNTPs 1X KAPA Taq Buffer A 1,5 U of KAPA Taq pol	95 °C for 2 min, 40 cycles of [95 °C for 30 s, 53 °C for 30 s, 72 °C for 50 sec], 72 °C for 10 min	522 bp
	28S				
	C1-J-1718	GGAGGATTTG GAAATTGATTA GTTC	10-20 ng gDNA 0,3-0,4 μM of each primer 0,4 μM dNTPs 1X KAPA Taq Buffer A 1,5 U of KAPA Taq pol	95 °C for 2 min, 40 cycles of [95 °C for 30 s, 53 °C for 30 s, 72 °C for 50 sec], 72 °C for 10 min	422-444 bp
	C1-N-2191	CCCGGTAAAA TTAAAATATAA ACTTC			

Για τον έλεγχο της παρουσίας των μεταλλαγών ανθεκτικότητας *kdr* L1014F/C/S, στα είδη *Cx. pipiens* ενισχύθηκε τμήμα του γονιδίου *VGSC* (voltage-gated sodium channel) με τους εκκινητές *Cgd1* και *Cgd2* (Martinez-Torres et al., 1999). Το μέγεθος του προϊόντος ήταν ~500 bp και αλληλουχήθηκε με τον εκκινητή *Cgd1*.

Στα δείγματα *Ae. albopictus* ελέγχθηκε η παρουσία των μεταλλαγών *kdr* V1016G (*VGSC* περιοχή II) και I1532T, F1534C/L/S (*VGSC* περιοχή III) με ενίσχυση των αντίστοιχων τμημάτων που περιλαμβάνουν τις μεταλλαγές (Kasai et al., 2011). Ο

έλεγχος για την παρουσία της μεταλλαγής V1016G πραγματοποιήθηκε σε ομάδα 5-8 ατόμων, και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση ήταν οι kdr2 F και kdr2 R, και το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος ήταν 500bp. Τα προϊόντα αλληλουχήθηκαν με τον εκκινητή kdr2 F. Ο έλεγχος των μεταλλαγών I1532T και F1534C/L/S έγινε σε κάθε άτομο μεμονωμένα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι AegSCF7 F και AegSCF7 R, και το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος ήταν 740bp. Τα προϊόντα αλληλουχήθηκαν με τον εκκινητή AegSCR8.

Τα δείγματα *Cx. pipiens* και *Ae. albopictus* επίσης ελέγχθηκαν για την παρουσία των μεταλλαγών ανθεκτικότητας I1043L/M/F του γονιδίου 1 της συνθάσης της χιτίνης (*CHS-1*). Ένα τμήμα του γονιδίου που περιλαμβάνει την περιοχή των μεταλλαγών ενισχύθηκε με τους εκκινητές kkn F1 και kkn R2 σε ομάδες 5 με 8 ατόμων για τα δείγματα *Cx. pipiens*, ενισχύοντας ένα τμήμα 825 bp, το οποίο αλληλουχήθηκε με τον *Culex\_kkn* F2 εκκινητή (Grigoraki et al., 2017). Στα δείγματα *Ae. albopictus*, ένα τμήμα του ίδιου γονιδίου, μεγέθους 350 bp ενισχύθηκε με τους εκκινητές kkn F3 και kkn R3 και στη συνέχεια αλληλουχήθηκε με τον kkn F3 (Balaska et al., 2020).

Οι εκκινητές και οι συνθήκες των διαγνωστικών PCR αντιδράσεων δίνονται στον Πίνακα 5.2.

**Πίνακας 5.2: Εκκινητές, συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων και συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις παρακολούθησης της ανθεκτικότητας στόχου.**

Διαγνωστικό	Εκκινητής	Αλληλουχία (5' → 3')	Αντίδραση PCR	Συνθήκες PCR αντίδρασης
Culex pipiens VGSC L1014F/C/S	Cgd1	TGATTGTGTTT CGGGTGCTG	10-20 ng gDNA 0,4 μM of each primer 0,4 μM dNTPs 1X KAPA Taq Buffer A 1,5 U of KAPA Taq pol	95 °C for 5 min, 40 cycles of [95 °C for 30 s, 48 °C for 30 s, 72 °C for 40sec], 72 °C for 5 min
	Cgd2	GCAAGGCTAA GAAAAGGTTA AG		
Aedes albopictus VGSC V1016G	Kdr2 F	TTCACCGACTT CATGCACTC	10-20 ng gDNA 0,3 μM of each primer 0,4 μM dNTPs 1X KAPA Taq Buffer A 1,5 U of KAPA Taq pol	95 °C for 5 min, 40 cycles of [95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 30sec], 72 °C for 5 min
	Kdr2 R	CGCAATCTGG CTTGTTAACTT		
Aedes albopictus VGSC	AegSCF7 F	GAGAACTCGC CGATGAACTT	10-20 ng gDNA 0,3-0,4 μM of each primer	95 °C for 5 min, 40 cycles of [95 °C for 30 s, 57 °C for 30 s,



I1532T, F1534C/L/S	AegSCR7 R	GACGACGAAA TCGAACAGGT	0,4 μM dNTPs 1X KAPA Taq Buffer A 1,5 U of KAPA Taq pol	72 °C for 50sec], 72 °C for 5 min
	AegSCR8	AGCTTTCAGC GGCTTCTTC		
Culex pipiens CHS1 I1043L/M/F	Kkv F1	CCGCGTTCAA GATTGACAAC TGG	10-20 ng gDNA 0,4 μM of each primer 0,4 μM dNTPs 1X KAPA Taq Buffer A 1,5 U of KAPA Taq pol	95 °C for 5 min, 40 cycles of [95 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, 72 °C for 1 min], 72 °C for 5 min
	Kkv R2	TCCAGTAGGG GTTCGTCAGG		
	Kkv F2	GGCGAGGACG GAATCGG		
Aedes albopictus CHS1 I1043L/M/F	Kkv R3	TGGATACTTCA ATGGAACCTT CC	10-20 ng gDNA 0,3 μM of each primer 0,4 μM dNTPs 1X KAPA Taq Buffer A 1,5 U of KAPA Taq pol	95 °C for 5 min, 40 cycles of [95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 30sec], 72 °C for 5 min
	Kkv F3	TCGGAAGTCC TTCGGCTTATT C		

## 5.3 Αποτελέσματα

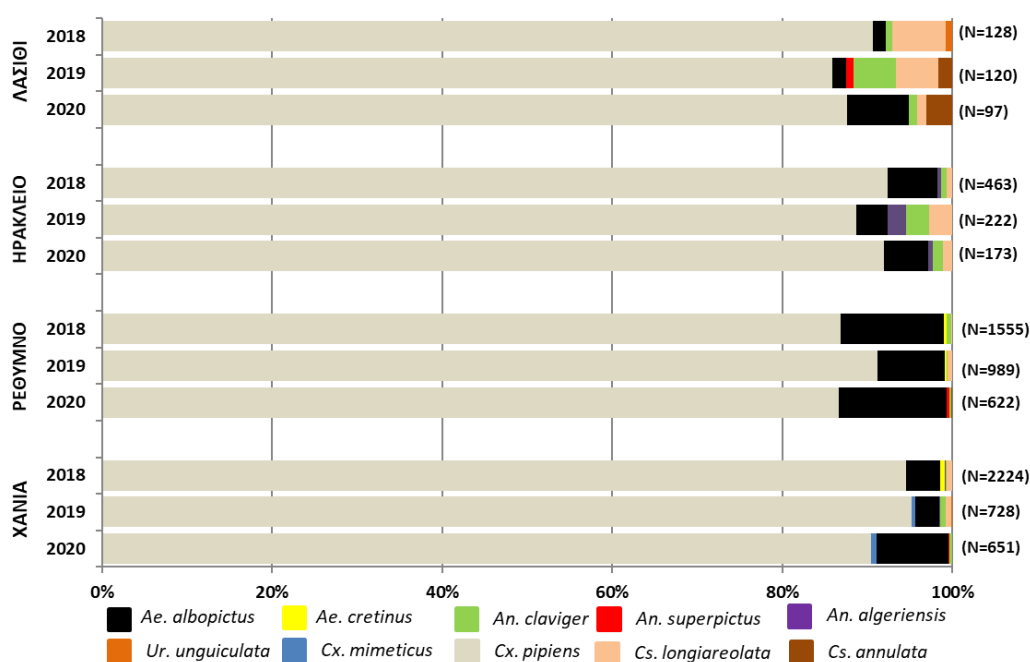
### 5.3.1 Πληθυσμιακή σύσταση και δυναμική των κουνουπιών

Συνολικά 7992 ανήλικα θηλυκά κουνούπια συλλέχθηκαν στην περιοχή της Κρήτης κατά τη διάρκεια των ετών 2018-2020, με την μεγάλη πλειοψηφία των ατόμων (6789 δείγματα) να έχουν συλληχθεί από τις ΠΕ των Χανίων και του Ρεθύμνου. Σε μεγαλύτερη αφθονία βρέθηκαν τα κουνούπια του γένους *Culex*, αντιπροσωπεύοντας πάνω από το 85% των συνολικών δειγμάτων που συλλέχθηκαν σε κάθε περιφέρεια. Εν συνεχεία, η σειρά που ακολούθησαν τα δείγματα σε αφθονία γένους ήταν τα *Aedes*, τα *Culiseta*, τα *Anopheles* και τέλος τα *Uranotaenia* (Εικόνα 5.2).

Όλα τα δείγματα που αναγνωρίστηκαν μορφολογικά και ανήκαν στο γένος *Culex*, ήταν μέλη του συμπλέγματος *Cx. pipiens*, εκτός από 7 δείγματα που αναγνωρίστηκαν

ως *Cx. mimeticus*. Τα δείγματα από το γένος *Culiseta* αναγνωρίστηκαν ως *Culiseta longiareolata* και *Culiseta annulata*, ενώ τα ελάχιστα δείγματα από το γένος *Uranotaenia* αναγνωρίστηκαν ως *Uranotaenia unguiculata*. Από τα δείγματα του γένους *Aedes*, ελάχιστα άτομα αναγνωρίστηκαν ως *Ae. detritus*, όμως η αναγνώριση των δειγμάτων *Aedes* και *Anopheles* σε μεγάλο ποσοστό ήταν δύσκολη λόγω των αλλοιωμένων μορφολογικών χαρακτήρων, απαραίτητων για την αναγνώρισή τους.

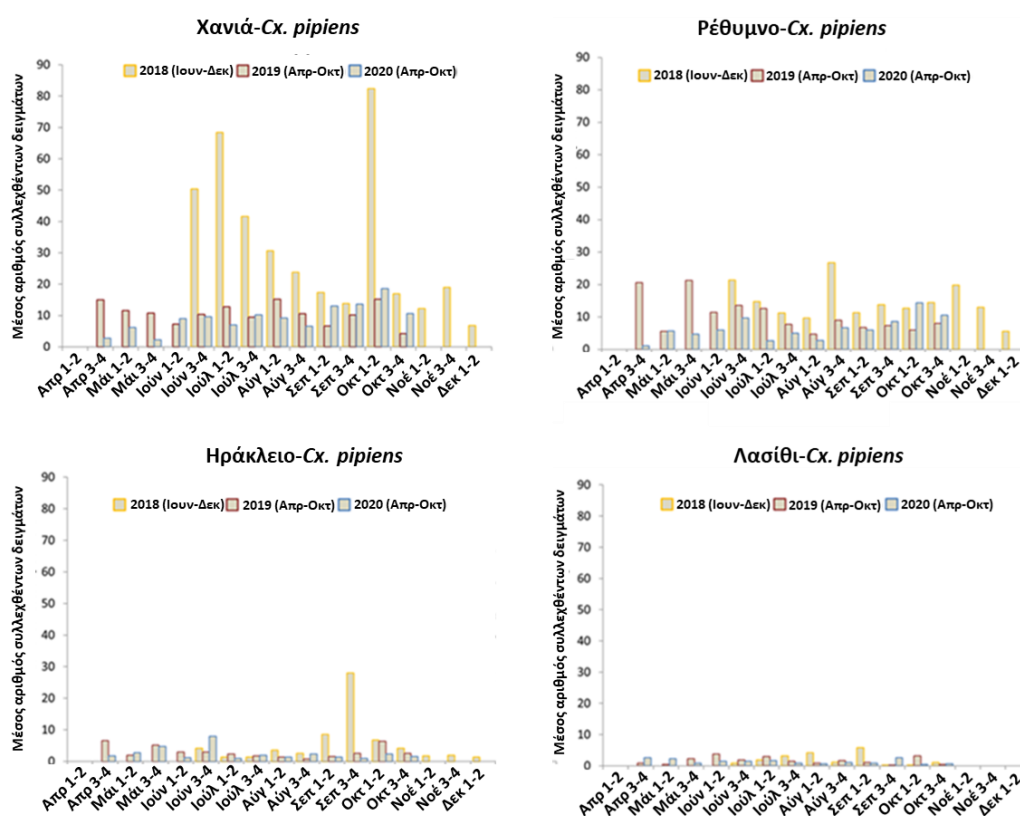
Η συνολική πυκνότητα των πληθυσμών για το διάστημα των τριών ετών ήταν υψηλότερη στην ΠΕ Χανίων (3407 δείγματα), και ακολούθησαν με φθίνουσα σειρά η ΠΕ Ρεθύμνου (2789 δείγματα), η ΠΕ Ηρακλείου (784 δείγματα) και η ΠΕ Λασιθίου (304 δείγματα) (Εικόνα 5.2). Ο μέγιστος αριθμός συλλεχθέντων δειγμάτων *Cx. pipiens* καταγράφηκε και στις 4 ΠΕ κατά τη διάρκεια του έτους 2018. Η διαφορά αυτή ήταν ιδιαίτερα έντονη στα Χανιά, την ΠΕ με το μεγαλύτερο αριθμό σε κουνούπια του γένους *Culex*. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ο μέσος αριθμός συλλεχθέντων ατόμων ανά νύχτα στην ΠΕ Χανίων ήταν 32 το 2018, ενώ μειώθηκε σε 10,7 το 2019 και σε 6,9 το 2020.



**Εικόνα 5.2:** Πληθυσμιακή σύνθεση ενήλικων θηλυκών κουνουπιών, κατανομημένη σε γένη, ανά Περιφερειακή Ενότητα. N: συνολικός αριθμός ενήλικων θηλυκών κουνουπιών που συλλέχθηκαν ανά ΠΕ κατά τα έτη 2018-2020. spp: είδη (species).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.3, το 2018 στα Χανιά, οι πληθυσμοί *Cx. pipiens* έδειξαν υψηλότερη δραστηριότητα κατά τους μήνες Ιούνιο-Ιούλιο και ακολούθησε μία

πτώση τους επόμενους τρεις μήνες. Όμως, μία ξαφνική άνοδος καταγράφηκε κατά το πρώτο δεκαπενθήμερο του Οκτώβρη, η οποία είχε μικρή διάρκεια δεδομένου ότι το επόμενο δεκαπενθήμερο οι πληθυσμοί έπεσαν στα επίπεδα που βρίσκονταν και πριν. Μία παρόμοια τάση παρατηρήθηκε και στο Ηράκλειο κατά το δεύτερο δεκαπενθήμερο του Σεπτεμβρίου το 2018. Κατά τα έτη 2019 και 2020, οι πληθυσμοί *Cx. ripiens* στα Χανιά και στο Ηράκλειο εμφάνισαν μία σχετικά σταθερή δραστηριότητα η οποία δείχνει να φθίνει κατά τον Οκτώβρη. Τη ίδια, σχετική σταθερότητα παρουσίασαν και οι πληθυσμοί από το Ρέθυμνο και το Ηράκλειο κατά τη διάρκεια και των τριών ετών.



**Εικόνα 5.3: Δυναμική των πληθυσμών *Culex ripiens* ανά Περιφερειακή Ενότητα.** Οι στήλες αντιστοιχούν στο μέσο αριθμό δειγμάτων που συλλέχθηκαν ανά δύο εβδομάδες. 1-2: πρώτες δύο εβδομάδες του μήνα, 3-4: τελευταίες δύο εβδομάδες του μήνα. (Ιούν-Δεκ): η συλλογή πραγματοποιήθηκε κατά τους μήνες Ιούνιο-Δεκέμβριο, (Απρ-Οκτ): η συλλογή πραγματοποιήθηκε κατά τους μήνες Απρίλιο-Οκτώβριο.

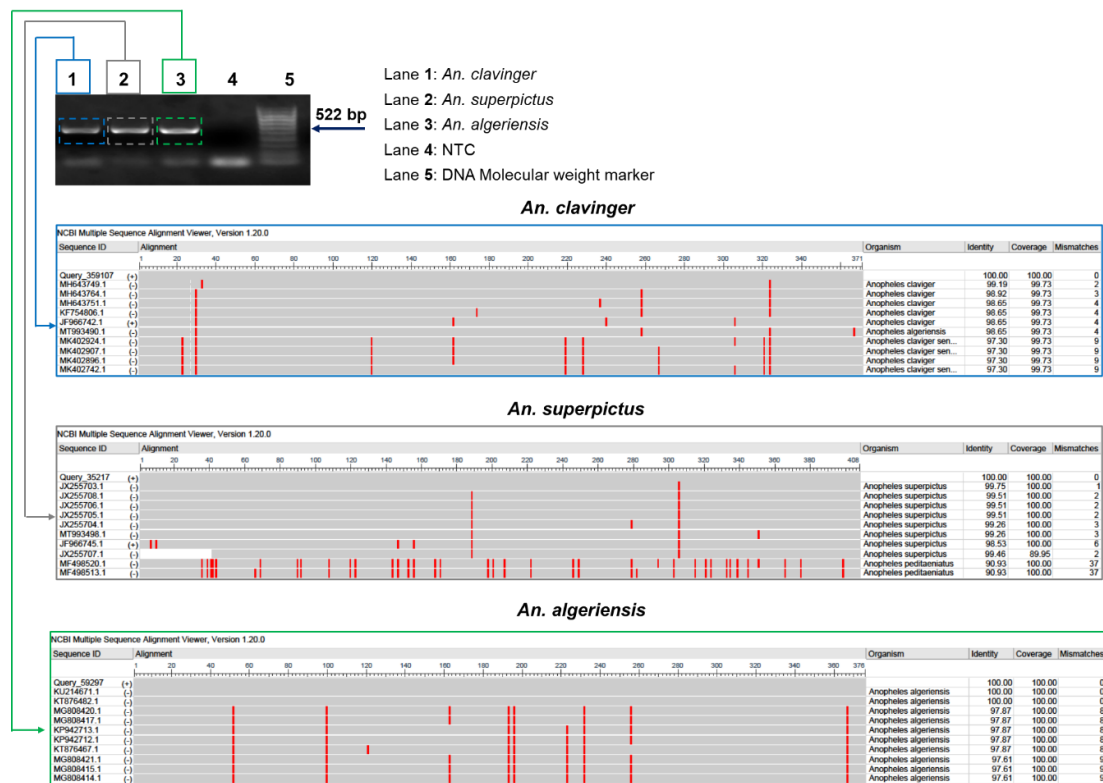
Στα πλαίσια της μοριακής ταυτοποίησης των ειδών των δειγμάτων, αναλύθηκαν συνολικά 401 δείγματα που είχαν αναγνωρισθεί μορφολογικά ως μέλη του *Cx ripiens* συμπλέγματος. Όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν ταυτοποιήθηκαν μοριακά ως *Culex ripiens* ss (Πίνακας 5.3). Συνολικά για ταυτοποίηση του είδους αναλύθηκαν 194 δείγματα του γένους *Aedes*, και τα περισσότερα από αυτά ταυτοποιήθηκαν ως *Ae. albopictus*, σε ποσοστό μεγαλύτερο από 86% σε όλες τις ΠΕ. Το είδος *Ae. cretinus*

καταγράφηκε μόνο στα Χανιά και στο Ρέθυμνο, σε αρκετά χαμηλούς αριθμούς (Πίνακας 5.3).

**Πίνακας 5.3: Είδη κουνουπιών-φορέων ασθενειών, βάσει της μοριακής ταυτοποίησης.** Παρουσιάζονται ανά Περιφερειακή Ενότητα. (Η μοριακή ανάλυση των δειγμάτων κατά τα έτη 2018-2019 πραγματοποιήθηκε από την Μπαλάσκα Σοφία και τον Δρ. Φωτάκη Εμμανουήλ-Αλέξανδρο).

ΠΕ	<i>Culex</i>		<i>Aedes</i>			<i>Anopheles</i>			
	N	<i>pipiens</i> s.s.	N	<i>albopictus</i>	<i>cretinus</i>	N	<i>claviger</i>	<i>algeriensis</i>	<i>superpictus</i>
Χανιά	11	100(	8	86,5(%)	13,5(	9	66,7(	22,2(%)	11,1(%)
	5	%)	9		%)		%)		
Ρέθυμνο	12	100(	9	97,8(%)	2,2(%)	4	50(%)	-	50(%)
	2	%)	2						
Ηράκλειο	10	100(	7	100(%)	-	6	50(%)	50(%)	-
	1	%)							
Λασιθί	63	100(	6	100(%)	-	1	90(%)	-	10(%)
		%)				0			

Τέλος, 29 δείγματα του γένους *Anopheles* αναλύθηκαν, εκ των οποίων το είδος *An. superpictus* καταγράφηκε στα Χανιά, Ρέθυμνο και Λασιθί, το *An. claviger* βρέθηκε σε όλες τις ΠΕ και το είδος *An. algeriensis* βρέθηκε στα Χανιά και στο Ηράκλειο (Εικόνα 5.4, Πίνακας 5.3).



Εικόνα 5.4: Ανίχνευση του φορέα της ελονοσίας *An. superpictus*. Εφαρμογή του COI διαγνωστικού σε άτομα του γένους *Anopheles* (επάνω), Ανάλυση Megablast (παρουσιάζονται τα 10 πρώτες στοιχίσεις) για το διαχωρισμό του είδους (κάτω).

### 5.3.2 Ανθεκτικότητα των κουνουπιών-φορέων στα εντομοκτόνα

Συνολικά αναλύθηκαν 253 *Cx. ripiens* δείγματα, από όλα τα έτη και από όλες τις ΠΕ, για τον έλεγχο της παρουσίας των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στο diflubenzuron, της θέσης 1043 του CHS γονιδίου. Η μεταλλαγή I1043F, που σχετίζεται με έντονο φαινότυπο ανθεκτικότητας, βρέθηκε σε ομοζυγωτία σε δύο δείγματα που είχαν συλλεχθεί από την περιοχή του Αγίου Νικολάου της ΠΕ Λασιθίου, το 2020, που αντιστοιχεί σε συχνότητα αλληλομόρφου 8% (στο Λασιθί). Στις υπόλοιπες ΠΕ όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν ήταν ομοζυγωτά για το αγρίου τύπου/ευαίσθητο αλληλόμορφο I1043 (Πίνακας 5.4). Για τις αντίστοιχες μεταλλαγές ανθεκτικότητας ελέγχθηκαν και 115 δείγματα *Ae. albopictus*, όμως καμία μεταλλαγή ανθεκτικότητας δεν ανιχνεύτηκε.

Επιπλέον, 362 δείγματα κουνουπιών *Cx. ripiens* ελέγχθηκαν για τις μεταλλαγές ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα, στη θέση 1014 του γονιδίου VGSC. Και

οι τρεις εναλλακτικές μεταλλαγές, L1014F/C/S, εντοπίστηκαν, με τον αγρίου τύπου/ευαίσθητο αλληλόμορφο να βρίσκεται σε πολύ χαμηλές συχνότητες (από 4,4 έως 7,9% στις 4 ΠΕ) (Πίνακας 5.4). Η μεταλλαγή L1014C βρέθηκε σε αρκετά υψηλή συχνότητα ( $\geq 74\%$  και στις 4 ΠΕ), ακολούθησε η μεταλλαγή L1014F (συχνότητες από 15 έως 19,8%), με υψηλότερη την παρουσία της στο Λασίθι (συχνότητα 30% το 2020). Η μεταλλαγή L1014S ανιχνεύτηκε σε χαμηλές σχετικά συχνότητες (από 0,6 έως 3,5%) στα Χανιά, Ρέθυμνο και Ηράκλειο (Πίνακας 5.4).

106 δείγματα *Ae. albopictus* αναλύθηκαν για την ανίχνευση των *kdr* μεταλλαγών ανθεκτικότητας I1532T and F1534C, της περιοχής III του VGSC και της μεταλλαγής V1016G της περιοχής II του ίδιου γονιδίου. Η μεταλλαγή I1532T βρέθηκε στα Χανιά σε συχνότητα 4,3%, στο Ρέθυμνο 2,3% και στο Ηράκλειο 7,1%. Η μεταλλαγή F1534C βρέθηκε σε υψηλότερες συχνότητες και σε όλες τις ΠΕ. Η υψηλότερη συχνότητα καταγράφηκε στο Ρέθυμνο (46,6%), η αμέσως χαμηλότερες στο Ηράκλειο (35,7%) και στα Χανιά (33,7%), και σε πιο χαμηλά επίπεδα στο Λασίθι (25%). Η μεταλλαγή V1016G δεν βρέθηκε σε κάποιο από τα δείγματα που ελέγχθηκαν (Πίνακας 5.4).

Τέλος, από τα 15 δείγματα του γένους *Anopheles* που ελέγχθηκαν για τη μεταλλαγή ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα στη θέση 1014 του VGSC γενετικού τύπου, όλα έφεραν μόνο το ευαίσθητο αλληλόμορφο L1014.

**Πίνακας 5.4: Συχνότητες αλληλομόρφων (%) του VGSC (1014, 1016, 1532, 1534), και του CHS (1043) σε δείγματα κουνουπιών *Cx. pipiens* και *Ae. albopictus* από όλες τις ΠΕ της Κρήτης, για τα έτη 2018-2020** (Η μοριακή ανάλυση για τα έτη 2018-2019 πραγματοποιήθηκε από τους Μπαλάσκα Σοφία, Ταντή Φιλλιάννα και Δρ. Φωτάκη Εμμανουήλ-Αλέξανδρο).

	ΠΕ	N	Συχνότητα αλληλομόρφων %* (ελάχιστη-μέγιστη συχνότητα %)^					
			Αλληλόμορφο αγρίου τύπου	Kdr μεταλλαγές				
<i>Cx. pipiens</i> VGSC locus 1014			L1014	1014F			1014C	1014S
	Chania	216	7,9 (0-12)	16,7 (12,9-26,5)	74 (62-78,8)	1,4 (0-6)		
	Rethymnon	204	6,4 (0-8,9)	15,8 (6,7-19,4)	74,3 (66,1-93,3)	3,5 (0-5,6)		
	Heraklion	180	4,4 (2-10)	15 (9-23,3)	80 (66-89)	0,6 (0,2)		
	Lasithi	126	4,8 (0-12,5)	19,8 (11,8-30)	75,4 (57,5-85,3)	0		
<i>Ae. albopictus</i> VGSC loci 1016, 1532, 1534			V1016	I1532	F1534	1016G	1532T	1534C
	Chania	102	100	95,7 (93-100)	66,3 (56,7-70,2)	0	4,3 (0-6,3)	33,7 (30-43)
	Rethymnon	88	100	97,7 (96-98,1)	53,4 (51-57,1)	0	2,3 (1,5-3,6)	46,6 (42,9-49)
	Heraklion#	14	100	92,9	64,3	0	7,1	35,7
	Lasithi#	8	100	100	75	0	0	25

Cx. <i>ripriens</i> CHS1 locus 1043			Αλληλόμορφο αγρίου τύπου	CHS1 μεταλλαγές		
			11043	1043M	1043F	1043L
	Chania	118	100	0	0	0
	Rethymnon	174	100	0	0	0
	Heraklion	100	100	0	0	0
	Lasithi	104	96,16 (0-92)	0	3,84 (0-8)	0

N: αριθμός αλληλομόρφων, \* οι σχετικές συχνότητες αλληλομόρφων προέρχονται από όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν κατά τα έτη 2018-2020, ^ η ελάχιστη και η μέγιστη σχετική συχνότητα που καταγράφηκε (ανα ΠΕ) από τα ετήσια δείγματα, # η ελάχιστη και η μέγιστη συχνότητα δεν δίνονται γιατί αναλύθηκαν μόνο δείγματα κατά το έτος 2020.

## 5.3 Συζήτηση

Κατά τη διάρκεια τού τριετούς προγράμματος παρακολούθησης, σημαντικοί φορείς ασθενειών καταγράφηκαν σε όλες τις ΠΕ της Κρήτης, συμπεριλαμβανομένων του κύριου φορέα του ιού του Δυτικού Νείλου *Cx. ripriens* s.s., του φορέα αρμποιϊών *Ae. albopictus* και του φορέα της ελονοσίας *An. superpictus*.

Το είδος *Cx. ripriens* s.s. ήταν κυρίαρχο σε όλες τις περιοχές του νησιού. Αξιοσημείωτα, η αντιπροσώπευση από το είδος *Cx. ripriens* (σταθερά πάνω από 85% σε κάθε ΠΕ κατά τα έτη 2018-2020), ήταν παρόμοια με αυτή που καταγράφηκε στην Κρήτη κατά τα έτη 2014-2016 (μεταξύ 75-97%) (Patsoula et al., 2020), δείχνει μία σταθερότητα στην επικράτηση του είδους Καθ' όλη τη διάρκεια του προγράμματος παρακολούθησης, οι υψηλότερες πυκνότητες πληθυσμών *Cx. ripriens* καταγράφηκαν στις δυτικές ΠΕ (Χανιά και Ρέθυμνο), ενώ οι πληθυσμοί παρουσίασαν μεγαλύτερη δραστηριότητα κατά το έτος 2018. Αυτή η πληθυσμιακή δυναμική μπορεί εν μέρει να εξηγηθεί από το μοτίβο των βροχοπτώσεων που σημειώθηκε στην Κρήτη το 2018 (αυξημένες βροχοπτώσεις σε σχέση με το 2019 και 2020, με το φαινόμενο πιο έντονο στα Χανιά και στο Ρέθυμνο) (HNMS, 2021). Η παρατηρούμενη εποχικότητα των πληθυσμών *Culex* είναι σε συμφωνία με αυτή που έχει παρατηρηθεί σε άλλες περιοχές της Ελλάδας, με τον Ιούνιο έως το Σεπτέμβριο να παρουσιάζεται η μέγιστη δραστηριότητα (Fotakis et al., 2017).

Συγκριτικά με άλλες περιοχές της Ελλάδας, ο συνολικός αριθμός κουνουπιών που συλλέχθηκαν, δείχνει αρκετά μικρός, υποδεικνύοντας ένα σχετικά περιορισμένο αναπαραγωγικό δυναμικό των πληθυσμών στην Κρήτη, την τρέχουσα χρονική περίοδο. Συγκεκριμένα, στην Κρήτη το 2018 (έτος που καταγράφηκε ο μεγαλύτερος αριθμός παγίδευσης) παγιδεύονταν κατά μέσο όρο 18,3 θηλυκά κουνούπια/νύχτα, ενώ στη Θεσσαλονίκη το αντίστοιχο νούμερο ήταν 1944 θηλυκά κουνούπια/νύχτα (Fotakis

et al., 2017). Σε κάθε περίπτωση όμως, πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη η κύρια παρουσία πληθυσμών φορέων ασθενειών σε αστικές και ημιαστικές περιοχές και στις 4 ΠΕ, ώστε να συνεχιστούν οι δράσεις παρακολούθησης αυτών. Μάλιστα, η υπερέχουσα αφθονία του είδους *Cx. ripiens*, σε συνδυασμό με την αξιολογηθείσα παρουσία του υβριδικού βιότυπου (>20%) (Fotakis et al., 2021), ο οποίος θεωρείται πολύ ανταγωνιστικός φορέας του WNV, αποτελούν παράγοντες ρίσκου για τη μετάδοση του WNV στην περιοχή.

Η παρουσία του *Ae. albopictus* σε όλες τις ΠΕ συμβαδίζει με προηγούμενα εντομολογικά ευρήματα (Balaska et al., 2020), ότι συναντάται πολύ περισσότερο σε σχέση με το αυτόχθον είδος *Ae. cretinus*, γεγονός που πιθανόν υποδεικνύει μία ανταγωνιστική επικράτηση του ενός είδους έναντι του άλλου. Ωστόσο, είναι πιθανή μία υποεκτίμηση σε σχέση με τους πραγματικούς πληθυσμούς του φορέα *Ae. albopictus*, δεδομένου ότι το είδος αυτό δραστηριοποιείται κατά τη διάρκεια της ημέρας, ενώ οι παγίδες τοποθετούνταν στις 18.00 της μίας ημέρας και συλλέγονταν στις 8.00 της επόμενης ημέρας, με αποτέλεσμα οι συλλήψεις να γίνονται μόνο κατά το μέγιστο της δραστηριότητας του φορέα.

Τρία είδη του γένους *Anopheles* καταγράφηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης στη Κρήτη. Το είδος *An. superpictus*, το οποίο θεωρείται κύριος φορέας της ελονοσίας στη Μέση Ανατολή και στην κεντρική Ασία (Raghavendra et al., 2011), και οι δευτερεύοντες φορείς της ελονοσίας, *An. claviger* και *An. algeriensis*. Παρά το γεγονός ότι τα άτομα του γένους *Anopheles* που συλλέχθηκαν ήταν λίγα, η παρουσία των παραπάνω ειδών και η πιθανή παρουσία και άλλων φορέων που ακόμα δεν έχουν καταγραφεί, αποτελούν εν δυνάμει απειλή για τη μετάδοση της ελονοσίας στην περιοχή.

Η μεταλλαγή I1043F στο ChS1 που προσδίδει ανθεκτικότητα στο diflubenzuron, I1043F, εντοπίστηκε στην ΠΕ Λασιθίου, στην περιοχή του Αγ. Νικολάου, με συχνότητα αλληλομόρφου 8%, σε κουνούπια *Cx. ripiens*. Η συγκεκριμένη μεταλλαγή έχει δειχθεί ότι συνεισφέρει στον έντονο φαινότυπο της ανθεκτικότητας στο εντομοκτόνο αυτό (Grigoraki et al., 2017). Αξιοσημείωτα, αυτή είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται η παρουσία της εν λόγω μεταλλαγής σε άτομα *Cx. ripiens* στην Ελλάδα, παρά τον εκτεταμένο έλεγχο για την παρουσία της σε διάφορες περιοχές στο παρελθόν (EA Fotakis et al., 2020; EA. Fotakis et al., 2020; Porretta et al., 2019) και συγκεκριμένα σε κατάσταση ομοζυγωτίας. Η παρουσία της I1043F μεταλλαγής στην Κρήτη, ανεξαρτήτως της προέλευσής της (είτε οφείλεται στην πίεση επιλογής είτε αποδίδεται σε μετανάστευση ατόμων που έφεραν το ανθεκτικό αλληλόμορφο) πρέπει να ληφθεί πολύ σοβαρά υπόψη, δεδομένου ότι η ενδεχόμενη εξάπλωσή της θα μπορούσε να



δημιουργήσει προβλήματα στην μέχρι τώρα αποτελεσματικότητα του diflubenzuron, κατά των πληθυσμών του κύριου φορέα του ιού του Δυτικού Νείλου, *Cx. pipiens*.

Στα άτομα *Ae. albopictus* που ελέγχθηκαν, καταγράφηκε μόνο το αλληλόμορφο αγρίου τύπου για τη συγκεκριμένη μεταλλαγή, δείκτης, ότι το diflubenzuron, ενδείκνυται για τον έλεγχο των τοπικών πληθυσμών *Ae. albopictus*.

Υψηλές συχνότητες μεταλλαγών στο VGSC καταγράφηκαν στους πληθυσμούς *Cx. pipiens* σε όλες τις ΠΕ. Αθροιστικά η συχνότητες των μεταλλαγών L1014F/C/S σε κάθε ΠΕ ήταν μεγαλύτερη του 92%, συγκριτικά αυξημένες σε σχέση με τις αντίστοιχες συχνότητες από άλλους πληθυσμούς της Ελλάδας (από 28 έως 88,3%) (EA Fotakis et al., 2020; Fotakis et al., 2017; Kiousos et al., 2014), ενώ η μεταλλαγή L1014C ήταν η πιο κοινή στους πληθυσμούς της Κρήτης ( $\geq 74\%$  σε κάθε ΠΕ). Μέχρι τώρα, πολύ λίγες μελέτες αναφέρουν την παρουσία της L1014C μεταλλαγής, συμπεριλαμβανομένων μία στην Ελλάδα (Fotakis et al., 2017), και συγκεκριμένα στη βόρεια Ελλάδα και στη δυτική Τουρκία (Taskin et al., 2016). Η ακριβής συνεισφορά της L1014C μεταλλαγής στο φαινότυπο της ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα δεν είναι ακόμα διευκρινισμένη. Εν τούτοις, η υψηλή συχνότητα της μεταλλαγής αυτής, σε σχέση με τη συχνότητα του αγρίου αλληλομόρφου, συστήνει τη συστηματική παρακολούθηση της στους τοπικούς πληθυσμούς.

Η μεταλλαγή L1014S βρέθηκε σε χαμηλές συχνότητες σε πληθυσμούς *Cx. pipiens* από τις ΠΕ Χανίων, Ρεθύμνου και Ηρακλείου, και έχει αναφερθεί επίσης μόνο στην Κίνα, την Ιαπωνία και τις Η.Π.Α. (Chen et al., 2010; Scott et al., 2015). Βέβαια, η ακριβής εξάπλωση των μεταλλαγών L1014C and L1014S δεν είναι γνωστή, δεδομένου ότι δεν υπάρχει μοριακή διαγνωστική μέθοδος που να διαχωρίζει τις τρεις διαφορετικές μεταλλαγές L1014F/C/S. Η διαγνωστική μέθοδος που εφαρμόζεται τα τελευταία χρόνια έδειξε ότι δεν διαχωρίζει τη μεταλλαγή L1014C από την ευρέως διαδεδομένη L1014F (βάσει προκαταρκτικών πειραμάτων – τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

Η συχνότητα των μεταλλαγών I1532T και F1534C του VGSC γονιδίου στα άτομα *Ae. albopictus* που ελέγχθηκαν, κυμάνθηκε μεταξύ 2,3-8,7% και 25-46,6% αντίστοιχα, ενώ η μεταλλαγή V1016G, που σχετίζεται με πιο έντονους φαινότυπους ανθεκτικότητας, δε βρέθηκε (Du et al., 2013; Kasai et al., 2019). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενη καταγραφή συχνοτήτων 1,7-6,5% για την I1532T και 29-48,3% και F1534C, καθώς και απουσία της V1016G μεταλλαγής στην Κρήτη (Balaska et al., 2020). Η μεταλλαγή F1534C βρέθηκε κυρίως σε ετεροζυγωτή κατάσταση, όποτε πιθανότατα δε συνεισφέρει σε αξιόλογα επίπεδα ανθεκτικότητας,

δεδομένου ότι (αν και δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί πλήρως) σχετίζεται με την ανθεκτικότητα μόνο όταν βρίσκεται σε ομοζυγωτία (Fan and Scott, 2020).

Οι σχεδόν εδραιωμένες μεταλλαγές στο VGSC στους πληθυσμούς *Cx. pipiens* και *Ae. albopictus* από την Κρήτη, πιθανόν οφείλονται σε μεταφορά στην περιοχή κουνουπιών που φέρουν ανθεκτικούς αλληλομόρφους ή/και στην έκθεση των πληθυσμών των κουνουπιών σε πίεση επιλογής (δηλ. πυρεθροειδή εντομοκτόνα). Ωστόσο, ενώ στην Κρήτη δεν έχουν πραγματοποιηθεί ευρείας κλίμακας εφαρμογές με πυρεθροειδή εντομοκτόνα για την καταπολέμηση των κουνουπιών, στην πραγματικότητα εφαρμόζονται σε ευρεία κλίμακα για την καταπολέμηση γεωργικών εχθρών ((Roditakis et al., 2009), βλ. Κεφ. 2). Όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενα κεφάλαια, τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς στα προγράμματα καταπολέμησης του δάκου της ελιάς, και η ανθεκτικότητα σε πυρεθροειδή εντομοκτόνα έχει ήδη διαπιστωθεί. Ενδεχομένως, αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει πίεση επιλογής και για πληθυσμούς των κουνουπιών, οδηγώντας στην εμφάνιση των παρατηρούμενων συχνοτήτων των μεταλλαγών στο VGSC γονίδιο, όπως έχει υποθεθεί και σε άλλες μελέτες (Fotakis et al., 2017; Mouhamadou et al., 2019; Porretta et al., 2019).

Τα σκευάσματα Bti, αποτελούν μία χρήσιμη ομάδα εντομοκτόνων για την καταπολέμηση των κουνουπιών, για τα οποία δεν έχει ακόμα αναφερθεί ανθεκτικότητα στα κουνούπια. Ωστόσο, στην Κρήτη δεν χρησιμοποιούνται σε πολύ μεγάλο βαθμό γι' αυτό το σκοπό, δεδομένου ότι δεν υπάρχουν πολλοί μεγάλοι όγκοι νερού (αναπαραγωγικές θέσεις των κουνουπιών), στους οποίους χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο τα σκευάσματα Bti (Becker and Lüthy, 2017). Επιπλέον, άλλα Bt σκευάσματα χρησιμοποιούνται σε ένα βαθμό για την αντιμετώπιση γεωργικών εχθρών στην περιοχή, οπότε θα ήταν αρκετά χρήσιμο να πραγματοποιηθούν βιοδοκιμές τοξικότητας σε προνύμφες από το πεδίο ώστε να επιβεβαιωθεί η ευαισθησία τους στα εν λόγω σκευάσματα.

Συμπερασματικά, η παρακολούθηση της μεταλλαγής I1043F, η διερεύνησης του ενδεχόμενου αντίκτυπου της παρουσίας της L1014C στην αποτελεσματικότητα των πυρεθροειδών στο πεδίο, η ανάπτυξη μοριακής διαγνωστικής μεθόδου που να διαχωρίζει τις μεταλλαγές 1014F/C/S, όπως και η εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των σκευασμάτων Bti θα μπορούσαν να συμβάλλουν αποτελεσματικά στη διαχείριση και έλεγχο των πληθυσμών των κουνουπιών της Κρήτης.

## Κεφάλαιο 6: Γενική Συζήτηση

## 6.1 Σύνοψη και μελλοντικές ερευνητικές κατευθύνσεις

Το αντικείμενο της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της ανθεκτικότητας, στα πλαίσια α) της παρακολούθησης της εξέλιξής της σε άγριους πληθυσμούς εντόμων και, β) της διερεύνησης των μηχανισμών της. Τα είδη εντόμων που μελετήθηκαν ήταν ο σοβαρότερος εχθρός της ελιάς *Bactrocera oleae*, και είδη κουνουπιών που είναι φορείς ασθενειών.

Στο Κεφάλαιο 2, πραγματοποιήθηκε παρακολούθηση άγριων πληθυσμών δάκου από διάφορες περιοχές της Ελλάδας για τον έλεγχο της κατάστασης της ανθεκτικότητας στις δραστικές ουσίες, alpha-cypermethrin, spinosad και dimethoate, οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρύτατα τα τελευταία χρόνια για την καταπολέμηση του εχθρού. Οι εργαστηριακές βιοδοκιμές τοξικότητας με alpha-cypermethrin έδειξαν αυξημένα επίπεδα ανθεκτικότητας στους περισσότερους πληθυσμούς που ελέγχθηκαν, με το φαινόμενο να είναι ιδιαίτερα έντονο στο νησί της Κρήτης, μία κυρίως ελαιοκομική περιοχή. Το ερώτημα που γεννήθηκε μετά από αυτή την παρατήρηση, ήταν εάν η ανθεκτικότητα αυτή έχει άμεση επίδραση και στις εφαρμογές καταπολέμησης στο πεδίο. Για το λόγο αυτό διεξήχθησαν δοκιμές τοξικότητας σε πραγματικές συνθήκες πεδίου, και τα αποτελέσματά μας έδωσαν ισχυρές ενδείξεις ότι, πράγματι, η ανθεκτικότητα που έχει εμφανιστεί φαίνεται να επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της δραστικής αυτής στους ψεκασμούς καταπολέμησης του εχθρού.

Οι εργαστηριακές βιοδοκιμές τοξικότητας διαγνωστικής δόσης με τη δραστική ουσία spinosad έδειξαν ότι σχεδόν όλοι οι πληθυσμοί δεν εμφανίζουν προβλήματα ανθεκτικότητας στη δραστική αυτή. Τέλος, αναφορικά με τη δραστική ουσία dimethoate, η εφαρμογή μοριακών διαγνωστικών μεθόδων για την εύρεση της συχνότητας των μεταλλαγών που έχουν συνδεθεί με την ανθεκτικότητα σε αυτό, έδειξε ότι οι μεταλλαγές αυτές είναι εγκατεστημένες στους πληθυσμούς της Ελλάδας που ελέγχθηκαν, πέραν ελάχιστων εξαιρέσεων. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι οι περισσότεροι πληθυσμοί φέρουν αξιοσημείωτα επίπεδα ανθεκτικότητας στο dimethoate.

Η συλλογή των παραπάνω επιστημονικών δεδομένων συμβάλλει στην επικαιροποίηση της γνώσης μας όσον αφορά την κατάσταση και εξέλιξη της

ανθεκτικότητας του δάκου στα εντομοκτόνα που ελέγχθηκαν, και κατ' επέκταση στη διαμόρφωση προγραμμάτων καταπολέμησης και διαχείρισης της ανθεκτικότητας με βάση τη γνώση αυτή. Στην ομάδα των πυρεθροειδών εντομοκτόνων, υπάρχουν κι άλλες διαθέσιμες δραστικές ουσίες, όπως lambda-cyhalothrin, deltamethrin και beta-cyfluthrin για τις οποίες θα ήταν ιδιαίτερα σκόπιμος ο εκτενής έλεγχος της παρουσίας διασταυρωτής ανθεκτικότητας. Επιπλέον, συστήνεται οι τακτικές καταπολέμησης του εντόμου, να επαναπροσδιοριστούν, τουλάχιστον ως προς χρήση των πυρεθροειδών εντομοκτόνων, περιορίζοντάς την, ιδιαίτερα σε περιοχές που ο φαινότυπος της ανθεκτικότητας ήταν έντονος, όπως η Κρήτη, συμβάλλοντας κατ' αυτό τον τρόπο στην ενδεχόμενη μελλοντική ανατροπή της ανθεκτικότητας και επιστροφή στην ευαισθησία.

Στην περίπτωση του spinosad και του dimethote, θα ήταν πολύ χρήσιμη η παραγωγή δεδομένων που αφορούν την αποτελεσματικότητα των δραστικών αυτών και σε πραγματικές συνθήκες, σε ελαιώνα. Στην παρούσα μελέτη, η μέθοδος που αναπτύχθηκε για την εκτίμηση της επίδρασης της ανθεκτικότητας στην αποτελεσματικότητα μίας δραστικής ουσίας στο πεδίο, ενδείκνυται να εφαρμοστεί και για άλλα εντομοκτόνα, παρά το γεγονός ότι η ακριβής επίδραση είναι δύσκολο να εκτιμηθεί. Η χρήση του dimethoate έχει απαγορευτεί από τον Ιούνιο του 2019, στα πλαίσια του σχετικού Ευρωπαϊκού Κανονισμού, όμως δεν αποκλείεται να αρθεί η απαγόρευσή του σε έκτακτες περιστάσεις έντονης προσβολής, και σε αυτή την περίπτωση θα ήταν ιδιαίτερα χρήσιμο να γνωρίζουμε την αποτελεσματικότητά του στο πεδίο. Αναφορικά με το spinosad, η ευαισθησία των πληθυσμών του δάκου σε αυτή τη δραστική επιβάλλεται να διαφυλαχθεί με όλα τα διαθέσιμα μέσα, όπως τον περιορισμένο αριθμό ψεκασμών ανά έτος και την εκτενή παρακολούθηση των πληθυσμών ώστε να ελαττώνεται/διακόπτεται η χρήση του όταν διαπιστώνεται εμφάνιση ανθεκτικότητας σε κάποιον από αυτούς. Σε αυτή την κατεύθυνση, η περαιτέρω και σε βάθος διερεύνηση των μηχανισμών που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στο spinosad, η εύρεση μοριακών δεικτών και η ανάπτυξη σχετικών μοριακών διαγνωστικών μεθόδων, θα ήταν ιδιαίτερα χρήσιμη στην ανίχνευση της ανθεκτικότητας όταν ακόμα βρίσκεται σε αρχικά στάδια ανάπτυξης.

Στο Κεφάλαιο 3 διερευνήθηκε ο μηχανισμός ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα. Προηγούμενες μελέτες είχαν δώσει ισχυρές ενδείξεις ότι οι P450 μονοοξυγενάσες εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα. Οι κλασσικές βιοδοκιμές τοξικότητας με το συνεργιστή PBO και η ανάλυση μεταγραφώματος μέσα από την οποία πραγματοποιήθηκε σύγκριση της έκφρασης γονιδίων από πολύ ανθεκτικούς, ένα μετρίως ανθεκτικό και ένα ευαίσθητο πληθυσμό

δάκου, προέκυψε μία ισχυρή επιβεβαίωση ότι οι P450 μονοοξυγενάσες εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα.

Από την ανάλυση μεταγραφώματος, προέκυψε ένα αριθμός P450 γονιδίων που υπερεκφράζονται στους πολύ ανθεκτικούς πληθυσμούς σε σχέση με τον μετρίως ανθεκτικό και τον ευαίσθητο, υποδεικνύοντας τη συνδυαστική δράση τους στην αποτοξικοποίηση του alpha-cypermethrin. Από αυτά τα γονίδια επιλέχθηκαν δύο P450 μονοοξυγενάσες *CYP6A23* και *CYP6G2* της *CYP6* οικογένειας, οι οποίες προηγουμένως είχαν επίσης στοχοποιηθεί σε προηγούμενη μελέτη ανθεκτικότητας του δάκου στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα, ώστε να αναλυθεί ο λειτουργικός τους ρόλος. Από τις επιβεβαιωτικές αναλύσεις της έκφρασής τους στους ανθεκτικούς πληθυσμούς και τη λειτουργική ανάλυση του ρόλου τους με την τεχνική της RNAi σίγησης, συμπεραίνουμε ότι πιθανότατα εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα. Ιδίως για την *CYP6A23*, η μείωση της έκφρασής της απέδωσε περισσότερη ευαισθησία στο εντομοκτόνο alpha-cypermethrin.

Η τεχνική της RNAi σίγησης στο δάκο φάνηκε να δουλεύει αρκετά καλά στο κομμάτι της διερεύνησης του ρόλου των γονιδίων αποτοξικοποίησης, επομένως αποτελεί μία χρήσιμη τεχνική η οποία μπορεί να εφαρμοστεί σε ανάλογες περιπτώσεις, άλλων, προς διερεύνηση γονιδίων. Ένα παράδειγμα αποτελούν εκείνα που έχουν προκύψει από την ανάλυση μεταγραφώματος (P450 γονίδια που βρέθηκαν να υπερεκφράζονται στους ανθεκτικούς πληθυσμούς) στην παρούσα μελέτη, τα οποία κρίνεται ιδιαίτερα σκόπιμο να μελετηθούν και να αναλυθεί ο λειτουργικός ρόλος τους. Αναμφισβήτητα, για την περαιτέρω επιβεβαίωση του ρόλου της *CYP6A23* και την αποσαφήνιση του ρόλου της *CYP6G2* επιπλέον επιστημονική προσπάθεια χρειάζεται, η οποία περιλαμβάνει α) *in vitro* μελέτη μεταβολισμού ώστε να απαντηθεί το ερώτημα αν η πρωτεΐνη αυτή δύναται να μεταβολίζει πυρεθροειδή ή/και άλλα είδη εντομοκτόνων, β) επιπλέον *in vivo* μελέτη του ρόλου της μέσω της διαγονιδιακή έκφρασή της στη *D. melanogaster* ή μη-έκφρασης της, μέσω του συστήματος CRISPR/Cas9, το οποίο ήδη έχει αναπτυχθεί και στο δάκο.

Στο Κεφάλαιο 4 ο μηχανισμός της ανθεκτικότητας διείσδυσης του deltamethrin διερευνήθηκε στον κύριο φορέα της ελονοσίας *An. gambiae*. Ο μειωμένος ρυθμός διείσδυσης του εντομοκτόνου σε ανθεκτικά κουνούπια και η ποσοτική ανάλυση των επιδερμικών υδρογονανθράκων στα σώματα και στα πόδια των κουνουπιών έδειξαν ότι αλλαγές στη σύνθεση του επιδερμιδίου αποτελούν προσαρμογή που συμβάλλει στην ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα, στο *An. gambiae*. Μία υπόθεση που έχει προταθεί είναι ότι η καθυστέρηση της

Ο μηχανισμός αυτός είναι υψίστης σημασίας για τη διαχείριση της ανθεκτικότητας, δεδομένου ότι τέτοιου είδους μηχανισμοί συμβάλλουν στην ανθεκτικότητα σε όλες τις ομάδες εντομοκτόνων, οπότε, σε αυτή την περίπτωση, πρακτικές διαχείρισης, όπως η εναλλαγή των εντομοκτόνων με διαφορετικό τρόπο δράσης, ίσως καθίστανται αναποτελεσματικές. Οι αλλαγές στο επιδερμίδιο έχουν συνδεθεί με υπερέκφραση γονιδίων επιδερμικών πρωτεϊνών (Cuticular proteins, CP), πρωτεΐνες του κυτοχρώματος P450 και ABC μεταφορείς. Αν και υπάρχουν αρκετές μελέτες σε έντομα γεωργικής και υγειονομικής σημασίας οι οποίες με διάφορες μεθόδους δείχνουν τη μειωμένη διείσδυση του εντομοκτόνου μέσω του επιδερμιδίου, οι μελέτες που αφορούν συγκεκριμένες πρωτεΐνες που σχετίζονται με αυτό το μηχανισμό είναι πολύ λίγες. Η διαλεύκανση του μηχανισμού μέσω της εύρεσης των πρωτεϊνών που εμπλέκονται και της αλληλεπίδρασής τους, θα πρέπει να είναι στις άμεσες προτεραιότητες, εφόσον αφορούν έναν μηχανισμό ανθεκτικότητας με τόσο ευρεία εφαρμογή, και σε συνδυασμό με άλλους μηχανισμούς δύναται να αποδώσει πολύ ισχυρούς φαινοτύπους.

Επιπλέον, η διερεύνηση του μηχανισμού ανθεκτικότητας διείσδυσης και σε σημαντικούς ευρωπαϊκούς ή ελληνικούς πληθυσμούς φορέων ασθενειών ή γεωργικών εχθρών θα ήταν ιδιαίτερα χρήσιμη στη διαχείριση του φαινομένου της ανθεκτικότητας.

Στο Κεφάλαιο 5, μία τριετής συλλογή και παρακολούθηση δεδομένων πληθυσμιακής σύστασης και ανθεκτικότητας διεξήχθη στο νησί της Κρήτης, σε κουνούπια-φορείς σημαντικών ασθενειών. Από αυτήν προέκυψαν τρία κύρια ευρήματα, α) την παρουσία ειδών κουνουπιών στην Κρήτη, που αποτελούν σημαντικούς φορείς ασθενειών και ανήκουν στα γένη *Culex*, *Aedes* και *Anopheles*, με τη μεγάλη πλειονότητα των ατόμων να ανήκουν στο είδος *Cx. pipiens*, β) η μεταλλαγή (I1043F) ανθεκτικότητας στο diflubenzuron, αν και σε μικρό ποσοστό, ανιχνεύτηκε (για πρώτη φορά) σε άτομα του είδους *Cx. pipiens*, και γ) οι γνωστές μεταλλαγές ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα είναι όλες παρούσες στα είδη *Cx. pipiens* (L1014F/C/S), και μάλιστα σε υψηλές αθροιστικά συχνότητες, ενώ στους πληθυσμούς *Ae. albopictus* βρέθηκαν οι μεταλλαγές I1532T και F1534C σε χαμηλές και μέτριες συχνότητες αντίστοιχα.

Μία τόσο εκτεταμένη μελέτη παρακολούθησης πραγματοποιείται για πρώτη φορά στο νησί της Κρήτης. Τα δεδομένα που συγκεντρώθηκαν μας παρέχουν μία καλή γνώση για τα είδη των φορέων ασθενειών που βρίσκονται στο νησί της Κρήτης, υποδεικνύοντας την εν δυνάμει επικινδυνότητα μετάδοσης ασθενειών. Επιπλέον, μας έδωσαν μία εκτίμηση για την υπάρχουσα κατάσταση της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα που εφαρμόζονται για την καταπολέμηση των φορέων αυτών. Αυτού του

είδους η επιστημονική γνώση, όταν παράγεται με συστηματικό (χρονικά) τρόπο για μία δεδομένη περιοχή, και αξιοποιείται από τους εμπλεκόμενους φορείς, μπορεί να συμβάλλει αποτελεσματικά στην καταπολέμηση των φορέων. Για παράδειγμα, η ανίχνευση της μεταλλαγής ανθεκτικότητας στο diflubenzuron (I1043F) στην ΠΕ Λασιθίου, δίνει την κατεύθυνση της πολύ προσεκτικής χρήσης του συγκεκριμένου σκευάσματος στην περιοχή, και της συνεχόμενης παρακολούθησης της εξάπλωσης της μεταλλαγής αυτής, ώστε να περιοριστεί η χρήση του, και να αντικατασταθεί με κάποιο άλλο (π.χ. Bti) πριν ο φαινότυπος της ανθεκτικότητας καταστήσει αναποτελεσματικές τις εφαρμογές καταπολέμησης.

Η ευρεία εξάπλωση των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα, στους πληθυσμούς *Culex* και *Aedes* σε όλες τις ΠΕ της Κρήτης, παρά το γεγονός ότι οι εφαρμογές των πυρεθροειδών είναι περιορισμένες στο πλαίσιο των προγραμμάτων καταπολέμησης, δημιουργεί ανησυχία για την αποτελεσματικότητά τους, εφόσον χρειαστεί να εφαρμοστούν πιο εκτεταμένα στο μέλλον. Με αυτά τα δεδομένα, ιδιαίτερα για τη μεταλλαγή L1014C, η οποία είναι σχεδόν εγκατεστημένη σε όλους τους πληθυσμούς της Κρήτης, αλλά και σε άλλες περιοχές της Ελλάδας, είναι ιδιαίτερα σκόπιμη η αποσαφήνιση του ρόλου της. Το σύστημα CRISPR/Cas9 έχει αποδειχθεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της συνεισφοράς των μεταλλαγών στο φαινότυπο της ανθεκτικότητας, και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και στην περίπτωση της L1014C.

## **6.2 Προτάσεις για τα διαθέσιμα εργαλεία παρακολούθησης της ανθεκτικότητας**

Σε όλες τις περιπτώσεις, γεωργικών εχθρών και εντόμων υγειονομικής σημασίας, η κατανόηση του εύρους και του μεγέθους της ανθεκτικότητας στους τοπικούς πληθυσμούς αποτελεί γνώση ζωτικής σημασίας για το σχεδιασμό και την εφαρμογή αποτελεσματικών στρατηγικών διαχείρισης της ανθεκτικότητας. Στην περίπτωση του δάκου και των κουνουπιών συγκεκριμένα, τα διαθέσιμα εργαλεία παρακολούθησης, αν και συνεισφέρουν σε ένα βαθμό στην εκτίμηση της υπάρχουσας ανθεκτικότητας, υπάρχουν κάποιες ελλείψεις μεταξύ των παραγόμενων δεδομένων και της πλήρους αξιοποίησής τους στις αποφάσεις που λαμβάνονται για τη διαχείριση της ανθεκτικότητας.



Οι βιοδοκιμές τοξικότητας αποτελούν το εργαλείο που παρέχει τα πιο σχετικά και άμεσα δεδομένα για την εκτίμηση της ανθεκτικότητας στα έντομα. Ωστόσο, ο δάκος της ελιάς και τα κουνούπια, ανήκουν σε μία κατηγορία εντόμων, που ενώ υπάρχουν εύκολα εφαρμόσιμες εργαστηριακές μέθοδοι βιοδοκιμών για την παραγωγή δεδομένων ανθεκτικότητας και μπορεί έτσι να καθοριστεί το εύρος της τοπικά, οι μέθοδοι αυτές υστερούν στο να μας παρέχουν ακριβείς πληροφορίες που αφορούν τις επιδράσεις της ανθεκτικότητας στην αποτελεσματικότητα των εμπορικών σκευασμάτων που χρησιμοποιούνται στις εφαρμογές καταπολέμησης. Επιπλέον, στην περίπτωση των κουνουπιών, τα περισσότερα δεδομένα προέρχονται από την εφαρμογή διαγνωστικών δόσεων με βάση τα τυπικά πρωτόκολλα του ΠΟΥ (WHO) και του CDC, τα οποία δεν εκτιμούν την ένταση της ανθεκτικότητας (Vontas and Mavridis, 2019).

Σίγουρα, υπάρχουν και μέθοδοι που εφαρμόζονται ή προσομοιάζουν το πεδίο (βλ. Κεφ. 2, (Ranson and Lissenden, 2016)), οι οποίες όμως απαιτούν μεγάλη προσπάθεια και είναι δύσκολο να εφαρμοστούν για μία ευρεία γκάμα εντομοκτόνων. Όμως, ακόμα και με τέτοιου είδους μεθόδους, όπου μετράται αποκλειστικά η θνησιμότητα μετά την έκθεση των εντόμων στο εντομοκτόνο, είναι δύσκολο να υπολογιστεί με ακρίβεια ο αντίκτυπος της ανθεκτικότητας όταν πολλές φορές δεν γνωρίζουμε ποιες άλλες μετέπειτα συνέπειες μπορεί να έχει η επαφή με το εντομοκτόνο ή ακόμα η ίδια η ανθεκτικότητα, στα έντομα που επιβιώνουν, όπως π.χ. στη μακροζωία τους, στην αναπαραγωγική τους ικανότητα και τη συμπεριφορά τους (Ranson, 2017; Rivero et al., 2010). Στην περίπτωση των φορέων της ελονοσίας, μία έμμεση προσέγγιση που προτείνεται για την άντληση δεδομένων σε αυτές τις περιπτώσεις είναι η αναδρομική ανάλυση των επιδράσεων της ανθεκτικότητας στη μετάδοση της ελονοσίας, σε χώρες που έχουν αλλάξει ομάδα εντομοκτόνων στις εφαρμογές καταπολέμησης (συνήθως επειδή έχει παρουσιαστεί ανθεκτικότητα ή έχουν αυξηθεί τα περιστατικά ελονοσίας), και έχει παρατηρηθεί βελτίωση στην καταπολέμηση (Ranson, 2017).

Αναμφισβήτητα, οι μοριακές διαγνωστικές μέθοδοι αποτελούν εξαιρετικά χρήσιμα εργαλεία στην παρακολούθηση της ανθεκτικότητας, οι οποίες μάλιστα υπερτερούν σε σχέση με τις βιοδοκιμές στο πλαίσιο της ανίχνευσης της ανθεκτικότητας σε πολύ αρχικά στάδια, πριν ακόμα εμφανιστεί ο φαινότυπος. Η συνεχής εξέλιξη των τεχνολογιών στους κλάδους της Γονιδιωματικής και της Μοριακής Βιολογίας, συμβάλλει δυναμικά στην ανάλυση των μηχανισμών που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα, με αποτέλεσμα να έχουμε συνεχώς διαθέσιμους νέους μοριακούς δείκτες για την ανίχνευσή της και κατ' επέκταση νέες διαγνωστικές μεθόδους. Όμως, υπάρχουν ζητήματα, τα οποία χρειάζονται αρκετή ακόμα και πολύπλευρη

προσπάθεια, ώστε να φτάσουμε σε ένα σημείο που όλα τα δεδομένα που παράγονται θα αξιοποιούνται πλήρως και θα συνεισφέρουν καθοριστικά στην ολοκληρωμένη διαχείριση της ανθεκτικότητας.

α) Η λεπτομερής ανάλυση των μηχανισμών ανθεκτικότητας και εκτίμηση η ακριβής συνεισφορά των νέων μοριακών δεικτών στην ανθεκτικότητα, είναι απαραίτητη, ώστε τελικά τα δεδομένα που προκύπτουν από την παρακολούθηση της ανθεκτικότητας να μπορούν να αξιοποιηθούν πλήρως και άμεσα στα προγράμματα καταπολέμησης (Van Leeuwen et al., 2020; Vontas and Mavridis, 2019).

β) Η διαθεσιμότητα εύκολα εφαρμόσιμων, χαμηλού κόστους και μεγάλης ακρίβειας μεθόδων οι οποίες να παρέχουν ταυτόχρονα δεδομένα για πολλούς μοριακούς δείκτες και σε ομάδες πολλών ατόμων είναι ακόμα αρκετά περιορισμένη. Τέτοιες μέθοδοι είναι απαραίτητες για παραγωγή πιο έγκυρων, μαζικών δεδομένων και σε σύντομο χρόνο, και πρέπει να γίνουν διαθέσιμες σε προγράμματα παρακολούθησης σε παγκόσμια κλίμακα (Dusfour et al., 2019).

γ) Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων και η άμεση διάχυσή τους σε όλους τους εμπλεκόμενους φορείς σε μία πολύ σαφή μορφή που να μπορούν να αξιοποιηθούν κατά την ώρα της λήψης των αποφάσεων του προγραμματισμού των στρατηγικών καταπολέμησης (Vontas and Mavridis, 2019).

Για να ξεπεραστούν όλα τα παραπάνω εμπόδια, και να περάσουμε σε πραγματικά αποτελεσματικές ολοκληρωμένες στρατηγικές καταπολέμησης, χρειάζεται η συνεχής και συντονισμένη προσπάθεια όλων των εμπλεκόμενων φορέων (ερευνητικά ιδρύματα, φορείς προγραμμάτων καταπολέμησης, βιομηχανία) για την πολύ στοχευμένη διερεύνηση της αποτελεσματικότητας των στρατηγικών καταπολέμησης, τη μελέτη των σχέσεων μεταξύ γονοτύπου και φαινοτύπου ανθεκτικότητας και τη συνεχή εξέλιξη και εύκολη πρόσβαση στα διαθέσιμα εργαλεία παρακολούθησης της ανθεκτικότητας.

Δεδομένου του πολύ περιορισμένου αριθμού σκευασμάτων, ο οποίος δεν επιτρέπει πιο κλασσικές πρακτικές διαχείρισης (εναλλαγή εντομοκτόνων), και μέχρι νέες εναλλακτικές αποτελεσματικές μέθοδοι να γίνουν διαθέσιμες, οφείλουμε να αξιοποιούμε τα εργαλεία μας στο μέγιστο δυνατό βαθμό, ώστε να μπορέσουμε να διαφυλάξουμε τη γεωργική παραγωγή και την ανθρώπινη ζωή, με σεβασμό προς το περιβάλλον που μας φιλοξενεί.

## Βιβλιογραφία

- Achee, N.L., Grieco, J.P., Vatandoost, H., Seixas, G., Pinto, J., Ching-NG, L., Martins, A.J., Juntarajumnong, W., Corbel, V., Gouagna, C., David, J.-P., Logan, J.G., Orsborne, J., Marois, E., Devine, G.J., Vontas, J., 2019. Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 13, e0006822. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006822>
- Adolfi, A., Poulton, B., Anthousi, A., Macilwee, S., Ranson, H., Lycett, G.J., 2019. Functional genetic validation of key genes conferring insecticide resistance in the major African malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 116, 25764–25772. <https://doi.org/10.1073/pnas.1914633116>
- Ahmad, M., Denholm, I., Bromilow, R.H., 2006. Delayed cuticular penetration and enhanced metabolism of deltamethrin in pyrethroid-resistant strains of *Helicoverpa armigera* from China and Pakistan. *Pest Management Science* 62, 805–810. <https://doi.org/10.1002/ps.1225>
- Albertini, A., Pizzolotto, R., Petacchi, R., 2017. Carabid patterns in olive orchards and woody semi-natural habitats: first implications for conservation biological control against *Bactrocera oleae*. *BioControl* 62, 71–83. <https://doi.org/10.1007/s10526-016-9780-x>
- Allahyari, M.S., Damalas, C.A., Ebadattalab, M., 2016. Determinants of integrated pest management adoption for olive fruit fly (*Bactrocera oleae*) in Roudbar, Iran. *Crop Protection* 84, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.03.002>
- Ant, T., Koukidou, M., Rempoulakis, P., Gong, H.-F., Economopoulos, A., Vontas, J., Alphey, L., 2012. Control of the olive fruit fly using genetics-enhanced sterile insect technique. *BMC Biol* 10, 51. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-51>
- APRD, 2021. Arthropod Pesticide Resistance Database | Michigan State University [WWW Document]. URL <https://www.pesticideresistance.org/> (accessed 7.27.21).
- Arora, A.K., Douglas, A.E., 2017. Hype or opportunity? Using microbial symbionts in novel strategies for insect pest control. *J Insect Physiol* 103, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.09.011>
- Arouri, R., Le Goff, G., Hemden, H., Navarro-Llopis, V., M'saad, M., Castañera, P., Feyereisen, R., Hernández-Crespo, P., Ortego, F., 2015. Resistance to lambda-cyhalothrin in Spanish field populations of *Ceratitis capitata* and metabolic resistance mediated by P450 in a resistant strain. *Pest Manag Sci* 71, 1281–1291. <https://doi.org/10.1002/ps.3924>
- Badieritakis, E., Papachristos, D., Latinopoulos, D., Stefopoulou, A., Kolimenakis, A., Bithas, K., Patsoula, E., Beleri, S., Maselou, D., Balatsos, G., Michaelakis, A., 2018. *Aedes albopictus* (Skuse, 1895) (Diptera: Culicidae) in Greece: 13 years of living with the Asian tiger mosquito. *Parasitol Res* 117, 453–460. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5721-6>
- Baer, F.C., McGahey, C., Wijeyaratne, P., AID/Zambia, 1999. Summary of EHP activities in Kitwe, Zambia, 1997-1999: Kitwe urban health programs. Environmental Health Project, Washington, DC.
- Baker, R., Herbert, R., Howse, P., Jones, O., Francke, W., Reith, W., 1980. Identification and synthesis of the major sex pheromone of the olive fly (*Dacus oleae*). <https://doi.org/10.1039/C39800000052>

- Balabanidou, V., Kampouraki, A., MacLean, M., Blomquist, G.J., Tittiger, C., Juárez, M.P., Mijailovsky, S.J., Chalepakis, G., Anthousi, A., Lynd, A., Antoine, S., Hemingway, J., Ranson, H., Lycett, G.J., Vontas, J., 2016. Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 9268–9273. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608295113>
- Balabanidou, V., Kefi, M., Aivaliotis, M., Kidou, V., Girotti, J.R., Mijailovsky, S.J., Juárez, M.P., Papadogiorgaki, E., Chalepakis, G., Kampouraki, A., Nikolaou, C., Ranson, H., Vontas, J., 2019. Mosquitoes cloak their legs to resist insecticides. *Proc Biol Sci* 286, 20191091. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.1091>
- Balaska, S., Fotakis, E.A., Kioulos, I., Grigoraki, L., Mpellou, S., Chaskopoulou, A., Vontas, J., 2020. Bioassay and molecular monitoring of insecticide resistance status in *Aedes albopictus* populations from Greece, to support evidence-based vector control. *Parasites & Vectors* 13, 328. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04204-0>
- Bass, C., Denholm, I., Williamson, M.S., Nauen, R., 2015. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pestic Biochem Physiol* 121, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.04.004>
- Bass, C., Field, L.M., 2011. Gene amplification and insecticide resistance. *Pest Manag Sci* 67, 886–890. <https://doi.org/10.1002/ps.2189>
- Becker, N., Lüthy, P., 2017. Mosquito Control With Entomopathogenic Bacteria in Europe, in: *Microbial Control of Insect and Mite Pests*. Elsevier, pp. 379–392. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803527-6.00026-3>
- Becker, N., Petric, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M., Dahl, C., Kaiser, A., 2010. *Mosquitoes and Their Control*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-92874-4>
- Beehler, J.W., Mulla, M.S., 1996. Larvicidal oils modify the oviposition behavior of *Culex* mosquitoes 21, 60–65.
- Bélanger, J., Pilling, D. (eds ), 2019. *The state of the world's biodiversity for food and agriculture*. FAO, Rome, Italy. <https://doi.org/10.4060/CA3129EN>
- Bellini, R., Zeller, H., Van Bortel, W., 2014. A review of the vector management methods to prevent and control outbreaks of West Nile virus infection and the challenge for Europe. *Parasit Vectors* 7, 323. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-323>
- Benelli, G., 2015. Research in mosquito control: current challenges for a brighter future. *Parasitol Res* 114, 2801–2805. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4586-9>
- Bhatt, S., Weiss, D.J., Cameron, E., Bisanzio, D., Mappin, B., Dalrymple, U., Battle, K.E., Moyes, C.L., Henry, A., Eckhoff, P.A., Wenger, E.A., Briët, O., Penny, M.A., Smith, T.A., Bennett, A., Yukich, J., Eisele, T.P., Griffin, J.T., Fergus, C.A., Lynch, M., Lindgren, F., Cohen, J.M., Murray, C.L.J., Smith, D.L., Hay, S.I., Cibulskis, R.E., Gething, P.W., 2015. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature* 526, 207–211. <https://doi.org/10.1038/nature15535>
- Bigiotti, G., Pastorelli, R., Belcari, A., Sacchetti, P., 2019. Symbiosis interruption in the olive fly: Effect of copper and propolis on *Candidatus Erwinia dacicola*. *Journal of Applied Entomology* 143, 357–364. <https://doi.org/10.1111/jen.12614>

- Bock, K.W., 2016. The UDP-glycosyltransferase (UGT) superfamily expressed in humans, insects and plants: Animal-plant arms-race and co-evolution. *Biochem Pharmacol* 99, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.10.001>
- Breman, J.G., 2001. The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden. *Am J Trop Med Hyg* 64, 1–11. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.64.1>
- Brown, A.W., 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *J Am Mosq Control Assoc* 2, 123–140.
- Bueno, A.M., Jones, O., 2002. Alternative methods for controlling the olive fly, *Bactrocera oleae*, involving semiochemicals. [WWW Document]. URL <https://www.cabi.org/ISC/abstract/20033044590> (accessed 7.31.21).
- Cacciola, S.O., Faedda, R., Sinatra, F., Agosteo, G.E., Schena, L., Frisullo, S., Lio, G.M. di S., 2012. Olive anthracnose. *Journal of Plant Pathology* 94, 29–44. <https://doi.org/10.4454/JPPFA2011001>
- Calderón-Fernández, G.M., Girotti, J.R., Juárez, M.P., 2012. Cuticular hydrocarbon pattern as a chemotaxonomy marker to assess intraspecific variability in *Triatoma infestans*, a major vector of Chagas' disease. *Med Vet Entomol* 26, 201–209. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2011.00978.x>
- Caleca, V., Lo Verde, G., Lo Verde, V., Palumbo Piccionello, M., Rizzo, R., 2010. Control of *Bactrocera oleae* and *Ceratitidis capitata* in Organic Orchards: Use of Clays and Copper Products. *Acta horticulturae*.
- Camp, J.V., Nowotny, N., 2020. The knowns and unknowns of West Nile virus in Europe: what did we learn from the 2018 outbreak? *Expert Rev Anti Infect Ther* 18, 145–154. <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1713751>
- Campbell, G.L., Marfin, A.A., Lanciotti, R.S., Gubler, D.J., 2002. West Nile virus. *Lancet Infect Dis* 2, 519–529. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(02\)00368-7](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(02)00368-7)
- Caputo, B., Dani, F.R., Horne, G.L., Petrarca, V., Turillazzi, S., Coluzzi, M., Priestman, A.A., della Torre, A., 2005. Identification and composition of cuticular hydrocarbons of the major Afrotropical malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae): analysis of sexual dimorphism and age-related changes. *J Mass Spectrom* 40, 1595–1604. <https://doi.org/10.1002/jms.961>
- Chandra, G., Bhattacharjee, I., Chatterjee, S.N., Ghosh, A., 2008. Mosquito control by larvivorous fish. *Indian J Med Res* 127, 13–27.
- Chen, L., Zhong, D., Zhang, D., Shi, L., Zhou, G., Gong, M., Zhou, H., Sun, Y., Ma, L., He, J., Hong, S., Zhou, D., Xiong, C., Chen, C., Zou, P., Zhu, C., Yan, G., 2010. Molecular Ecology of Pyrethroid Knockdown Resistance in *Culex pipiens pallens* Mosquitoes. *PLOS ONE* 5, e11681. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011681>
- Chung, H., Carroll, S.B., 2015. Wax, sex and the origin of species: Dual roles of insect cuticular hydrocarbons in adaptation and mating. *Bioessays* 37, 822–830. <https://doi.org/10.1002/bies.201500014>
- Cohuet, A., Harris, C., Robert, V., Fontenille, D., 2010. Evolutionary forces on *Anopheles*: what makes a malaria vector? *Trends in Parasitology* 26, 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.12.001>
- Collins, F.H., Paskewitz, S.M., 1996. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Mol Biol* 5, 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.1996.tb00034.x>

- Corbel, V., N'Guessan, R., 2013. Distribution, mechanisms, impact and management of insecticide resistance in malaria vectors: a pragmatic review, in: Manguin, S. (Ed.), *Anopheles Mosquitoes - New Insights into Malaria Vectors*. InTech. <https://doi.org/10.5772/56117>
- Culliney, T.W., 2014. Crop Losses to Arthropods, in: Pimentel, D., Peshin, R. (Eds.), *Integrated Pest Management: Pesticide Problems*, Vol.3. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 201–225. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-7796-5\\_8](https://doi.org/10.1007/978-94-007-7796-5_8)
- Curtis, C.F., Lines, J.D., Ijumba, J., Callaghan, A., Hill, N., Karimzad, M.A., 1987. The relative efficacy of repellents against mosquito vectors of disease. *Med Vet Entomol* 1, 109–119. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1987.tb00331.x>
- Daane, K.M., Johnson, M.W., 2010. Olive fruit fly: managing an ancient pest in modern times. *Annual Review of Entomology* 55, 151–169. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090553>
- Demant, L.L., Baldo, F.B., Sato, M.E., Raga, A., Paranhos, B.A.J., 2019. Deltamethrin resistance in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae): Selections, monitoring and effect of synergist. *Crop Protection* 121, 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.03.006>
- Denecke, S., Fusetto, R., Martelli, F., Giang, A., Battlay, P., Fournier-Level, A., O' Hair, R.A., Batterham, P., 2017. Multiple P450s and Variation in Neuronal Genes Underpins the Response to the Insecticide Imidacloprid in a Population of *Drosophila melanogaster*. *Sci Rep* 7, 11338. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11092-5>
- Denholm, I., Devine, G.J., Williamson, M.S., 2002. Evolutionary genetics. Insecticide resistance on the move. *Science* 297, 2222–2223. <https://doi.org/10.1126/science.1077266>
- Dermauw, W., Osborne, E.J., Clark, R.M., Grbić, M., Tirry, L., Van Leeuwen, T., 2013. A burst of ABC genes in the genome of the polyphagous spider mite *Tetranychus urticae*. *BMC Genomics* 14, 317. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-317>
- Dong, K., Du, Y., Rinkevich, F., Nomura, Y., Xu, P., Wang, L., Silver, K., Zhorov, B.S., 2014. Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 50, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.03.012>
- Du, W., Awolola, T.S., Howell, P., Koekemoer, L.L., Brooke, B.D., Benedict, M.Q., Coetzee, M., Zheng, L., 2005. Independent mutations in the Rdl locus confer dieldrin resistance to *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*. *Insect Mol Biol* 14, 179–183. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2005.00544.x>
- Du, Y., Nomura, Y., Satar, G., Hu, Z., Nauen, R., He, S.Y., Zhorov, B.S., Dong, K., 2013. Molecular evidence for dual pyrethroid-receptor sites on a mosquito sodium channel. *PNAS* 110, 11785–11790. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305118110>
- Dusfour, I., Vontas, J., David, J.-P., Weetman, D., Fonseca, D.M., Corbel, V., Raghavendra, K., Coulibaly, M.B., Martins, A.J., Kasai, S., Chandre, F., 2019. Management of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses: Advances and challenges. *PLoS Negl Trop Dis* 13, e0007615. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007615>
- ECDC, 2021. Malaria - Annual Epidemiological Report for 2019 [WWW Document]. European Centre for Disease Prevention and Control. URL

- <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/malaria-annual-epidemiological-report-2019> (accessed 8.1.21).
- ECDC, 2018. Epidemiological update: West Nile virus transmission season in Europe, 2018 [WWW Document]. European Centre for Disease Prevention and Control. URL <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-west-nile-virus-transmission-season-europe-2018> (accessed 8.1.21).
- Edi, C.V.A., Koudou, B.G., Jones, C.M., Weetman, D., Ranson, H., 2012. Multiple-Insecticide Resistance in *Anopheles gambiae* Mosquitoes, Southern Côte d'Ivoire. *Emerg Infect Dis* 18, 1508–1511. <https://doi.org/10.3201/eid1809.120262>
- Estes, A.M., Segura, D.F., Jessup, A., Wornoyaporn, V., Pierson, E.A., 2014. Effect of the symbiont *Candidatus Erwinia dacicola* on mating success of the olive fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *Int. J. Trop. Insect Sci.* 34, S123–S131. <https://doi.org/10.1017/S1742758414000174>
- Fan, Y., Scott, J.G., 2020. The F1534C voltage-sensitive sodium channel mutation confers 7- to 16-fold resistance to pyrethroid insecticides in *Aedes*. *Pest Manag Sci* 76, 2251–2259. <https://doi.org/10.1002/ps.5763>
- Fang, F., Wang, W., Zhang, D., Lv, Y., Zhou, D., Ma, L., Shen, B., Sun, Y., Zhu, C., 2015. The cuticle proteins: a putative role for deltamethrin resistance in *Culex pipiens pallens*. *Parasitol Res* 114, 4421–4429. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4683-9>
- FAO, 2009. How to Feed the World in 2050 [WWW Document]. URL [http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert\\_paper/How\\_to\\_Feed\\_the\\_World\\_in\\_2050.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf)
- Feyereisen, R., 2012. 8 - Insect CYP Genes and P450 Enzymes, in: Gilbert, L.I. (Ed.), *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. Academic Press, San Diego, pp. 236–316. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384747-8.10008-X>
- Feyereisen, R., 1995. Molecular biology of insecticide resistance. *Toxicology Letters, Proceedings of the International Congress of Toxicology - VII* 82–83, 83–90. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(95\)03470-6](https://doi.org/10.1016/0378-4274(95)03470-6)
- Feyereisen, R., Dermauw, W., Van Leeuwen, T., 2015. Genotype to phenotype, the molecular and physiological dimensions of resistance in arthropods. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 121, 61–77. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.01.004>
- Finney, D.J., 1971. *Probit Analysis*, 3rd ed. By D. J. Finney, Cambridge University Press, 32 E. 57th St., New York, Ny 10022, 1971. xv + 333 pp. 14.5 × 22 cm. Price \$18.50. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 60, 1432–1432. <https://doi.org/10.1002/jps.2600600940>
- Fletcher, B.S., 1989. Temperature-development rate relationships of the immature stages and adults of tephritid fruit flies.
- Fletcher, B.S., 1987. The Biology of Dacine Fruit Flies. *Annual Review of Entomology* 32, 115–144. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.32.010187.000555>
- Foley, D.H., Rueda, L.M., Wilkerson, R.C., 2007. Insight into Global Mosquito Biogeography from Country Species Records. *Journal of Medical Entomology* 44, 554–567. <https://doi.org/10.1093/jmedent/44.4.554>
- Fonseca, D.M., Keyghobadi, N., Malcolm, C.A., Mehmet, C., Schaffner, F., Mogi, M., Fleischer, R.C., Wilkerson, R.C., 2004. Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex. *Science* 303, 1535–1538. <https://doi.org/10.1126/science.1094247>

- Forgash, A.J., 1984. History, evolution, and consequences of insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 22, 178–186. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(84\)90087-7](https://doi.org/10.1016/0048-3575(84)90087-7)
- Fortuna, C., Remoli, M.E., Severini, F., Luca, M.D., Toma, L., Fois, F., Bucci, P., Boccolini, D., Romi, R., Ciufolini, M.G., 2015. Evaluation of vector competence for West Nile virus in Italian *Stegomyia albopicta* (= *Aedes albopictus*) mosquitoes. *Medical and Veterinary Entomology* 29, 430–433. <https://doi.org/10.1111/mve.12133>
- Foster, W.A., Walker, E.D., 2019. Chapter 15 - Mosquitoes (Culicidae), in: Mullen, G.R., Durden, L.A. (Eds.), *Medical and Veterinary Entomology* (Third Edition). Academic Press, pp. 261–325. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814043-7.00015-7>
- Fotakis, E., Mavridis, K., Kampouraki, A., Balaska, S., Tanti, F., Vlachos G, Gewehr S, Mourelatos S, Papadakis A, Kavalou M, Nikolakakis D, Moisaki M, Kampanis N, Loumpounis M, Vontas J, 2021. Mosquito population structure, pathogen surveillance and insecticide resistance monitoring in urban regions of Crete, Greece. *PLoS Negl Trop Dis*. 2022 Feb 17;16(2):e0010186. doi: 10.1371/journal.pntd.0010186.
- Fotakis, EA., Chaskopoulou, A., Grigoraki, L., Tsiamantas, A., Kounadi, S., Georgiou, L., Vontas, J., 2017. Analysis of population structure and insecticide resistance in mosquitoes of the genus *Culex*, *Anopheles* and *Aedes* from different environments of Greece with a history of mosquito borne disease transmission. *Acta Trop* 174, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.06.005>
- Fotakis, EA, Giantsis, I.A., Castells Sierra, J., Tanti, F., Balaska, S., Mavridis, K., Kourtidis, S., Vontas, J., Chaskopoulou, A., 2020. Population dynamics, pathogen detection and insecticide resistance of mosquito and sand fly in refugee camps, Greece. *Infectious Diseases of Poverty* 9, 30. <https://doi.org/10.1186/s40249-020-0635-4>
- Fotakis, EA., Mastrantonio, V., Grigoraki, L., Porretta, D., Puggioli, A., Chaskopoulou, A., Osório, H., Weill, M., Bellini, R., Urbanelli, S., Vontas, J., 2020. Identification and detection of a novel point mutation in the Chitin Synthase gene of *Culex pipiens* associated with diflubenzuron resistance. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 14, e0008284. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008284>
- Fournier, D., 2005. Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in insect populations. *Chemico-biological interactions, Proceedings of the VIII International Meeting on Cholinesterases* 157–158, 257–261. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.10.040>
- Fukuto, T.R., 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental Health Perspectives* 87, 245–254. <https://doi.org/10.1289/ehp.9087245>
- Garrett, W.D., White, S.A., 1977. Mosquito control with monomolecular organic surface films, 1: Selection of optimum film-forming agents. *Mosquito News*.
- Gatton, M.L., Chitnis, N., Churcher, T., Donnelly, M.J., Ghani, A.C., Godfray, H.C.J., Gould, F., Hastings, I., Marshall, J., Ranson, H., Rowland, M., Shaman, J., Lindsay, S.W., 2013. The importance of mosquito behavioural adaptations to malaria control in Africa. *Evolution* 67, 1218–1230. <https://doi.org/10.1111/evo.12063>



- Geng, C.X., Watson, G.B., Sparks, T.C., 2013. Nicotinic acetylcholine receptors as spinosyn targets for insect pest management. *Advances in Insect Physiology* 44, 101–210.
- Gibbs, A.G., 1998. Water-Proofing Properties of Cuticular Lipids. *Am Zool* 38, 471–482. <https://doi.org/10.1093/icb/38.3.471>
- Gregory, R., Darby, A.C., Irving, H., Coulibaly, M.B., Hughes, M., Koekemoer, L.L., Coetzee, M., Ranson, H., Hemingway, J., Hall, N., Wondji, C.S., 2011. A de novo expression profiling of *Anopheles funestus*, malaria vector in Africa, Using 454 pyrosequencing. *PLOS ONE* 6, e17418. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017418>
- Grigoraki, L., Puggioli, A., Mavridis, K., Douris, V., Montanari, M., Bellini, R., Vontas, J., 2017. Striking diflubenzuron resistance in *Culex pipiens*, the prime vector of West Nile Virus. *Sci Rep* 7, 11699. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12103-1>
- Gubler, D.J., 2007. The continuing spread of West Nile virus in the western hemisphere. *Clin Infect Dis* 45, 1039–1046. <https://doi.org/10.1086/521911>
- Gubler, D.J., 1998. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerg Infect Dis* 4, 442–450.
- Gunning, R.V., Ferris, I.G., Easton, C.S., 1994. Toxicity, penetration, tissue distribution, and metabolism of methyl parathion in *Helicoverpa armigera* and *H. punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol* 87, 1180–1184. <https://doi.org/10.1093/jee/87.5.1180>
- Guz, N., Cagatay, N.S., Fotakis, E.A., Durmusoglu, E., Vontas, J., 2020. Detection of diflubenzuron and pyrethroid resistance mutations in *Culex pipiens* from Muğla, Turkey. *Acta Trop* 203, 105294. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105294>
- Haniotakis, G.E., Kozyrakis, E., Bonatsos, C., 1986. Control of the olive fruit fly, *Dacus oleae* Gmel. (Dipt., Tephritidae) by mass trapping: Pilot scale feasibility study. *Journal of Applied Entomology* 101, 343–352. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1986.tb00868.x>
- Harbach, R.E., 2007. The Culicidae (Diptera): A review of taxonomy, classification and phylogeny \*. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.180118>
- Harris, A.F., Nimmo, D., McKemey, A.R., Kelly, N., Scaife, S., Donnelly, C.A., Beech, C., Petrie, W.D., Alphey, L., 2011. Field performance of engineered male mosquitoes. *Nat Biotechnol* 29, 1034–1037. <https://doi.org/10.1038/nbt.2019>
- Hawley, W.A., Phillips-Howard, P.A., Kuile, F.O.T., Terlouw, D.J., Vulule, J.M., Ombok, M., Nahlen, B.L., Gimnig, J.E., Kariuki, S.K., Kolczak, M.S., Hightower, A.W., 2003. Community-wide effects of permethrin-treated bed nets on child mortality and malaria morbidity in Western Kenya. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 68, 121–127. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2003.68.121>
- Hemingway, J., 2000. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 30, 1009–1015. [https://doi.org/10.1016/s0965-1748\(00\)00079-5](https://doi.org/10.1016/s0965-1748(00)00079-5)
- Hemingway, J., Hawkes, N.J., McCarroll, L., Ranson, H., 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology, Molecular and population biology of mosquitoes* 34, 653–665. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.03.018>

- Hemingway, J., Ranson, H., Magill, A., Kolaczinski, J., Fornadel, C., Gimnig, J., Coetzee, M., Simard, F., Roch, D.K., Hinzoumbe, C.K., Pickett, J., Schellenberg, D., Gething, P., Hoppé, M., Hamon, N., 2016. Averting a malaria disaster: will insecticide resistance derail malaria control? *Lancet* 387, 1785–1788. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00417-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00417-1)
- HNMS, 2021. Climatic data by month, HNMS, Hellenic National Meteorological Service [WWW Document]. Hellenic National Meteorological Service. URL [http://www.hnms.gr/emy/en/climatology/climatology\\_month](http://www.hnms.gr/emy/en/climatology/climatology_month) (accessed 8.1.21).
- Hoelmer, K.A., Kirk, A.A., Pickett, C.H., Daane, K.M., Johnson, M.W., 2011. Prospects for improving biological control of olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae), with introduced parasitoids (Hymenoptera). *Biocontrol Science and Technology* 21, 1005–1025. <https://doi.org/10.1080/09583157.2011.594951>
- Homem, R.A., Davies, T.G.E., 2018. An overview of functional genomic tools in deciphering insecticide resistance. *Current Opinion in Insect Science, Pests and resistance \* Behavioural ecology* 27, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.04.004>
- Howard, R.W., Blomquist, G.J., 2005. Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annu Rev Entomol* 50, 371–393. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130359>
- Hsu, J.-C., Feng, H.-T., Wu, W.-J., 2004. Resistance and Synergistic Effects of Insecticides in *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) in Taiwan. *Journal of Economic Entomology* 97, 1682–1688. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-97.5.1682>
- Hsu, J.-C., Feng, H.-T., Wu, W.-J., Geib, S.M., Mao, C., Vontas, J., 2012. Truncated transcripts of nicotinic acetylcholine subunit gene Bda6 are associated with spinosad resistance in *Bactrocera dorsalis*. *Insect Biochem Mol Biol* 42, 806–815. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.07.010>
- Huang, Y., Lu, X.-P., Wang, L.-L., Wei, D., Feng, Z.-J., Zhang, Q., Xiao, L.-F., Dou, W., Wang, J.-J., 2015. Functional characterization of NADPH-cytochrome P450 reductase from *Bactrocera dorsalis*: Possible involvement in susceptibility to malathion. *Sci Rep* 5, 18394. <https://doi.org/10.1038/srep18394>
- Huchard, E., Martinez, M., Alout, H., Douzery, E.J.P., Lutfalla, G., Berthomieu, A., Berticat, C., Raymond, M., Weill, M., 2006. Acetylcholinesterase genes within the Diptera: takeover and loss in true flies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273, 2595–2604. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3621>
- Hunter White, W., McCoy, C.M., Meyer, J.A., Winkle, J.R., Plummer, P.R., Kemper, C.J., Starkey, R., Snyder, D.E., 2007. Knockdown and Mortality Comparisons Among Spinosad-, Imidacloprid-, and Methomyl-Containing Baits Against Susceptible *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) Under Laboratory Conditions. *Journal of Economic Entomology* 100, 155–163. <https://doi.org/10.1093/jee/100.1.155>
- Iannotta, N., Noce, M.E., Ripa, V., Scalercio, S., Vizzarri, V., 2007. Assessment of susceptibility of olive cultivars to the *Bactrocera oleae* (Gmelin, 1790) and *Camarosporium dalmaticum* (Thüm.) Zachos & Tzav.-Klon. attacks in Calabria (Southern Italy). *J Environ Sci Health B* 42, 789–793. <https://doi.org/10.1080/03601230701551426>

- IRAC, 2021. Resistance basics | Insecticide Resistance Action Commiee (IRAC ) [WWW Document]. IRAC. URL <https://irac-online.org/about/resistance/> (accessed 7.30.21).
- Jayaraj, R., Megha, P., Sreedev, P., 2016. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdiscip Toxicol* 9, 90–100. <https://doi.org/10.1515/intox-2016-0012>
- Jones, C.M., Haji, K.A., Khatib, B.O., Bagi, J., Mcha, J., Devine, G.J., Daley, M., Kabula, B., Ali, A.S., Majambere, S., Ranson, H., 2013. The dynamics of pyrethroid resistance in *Anopheles arabiensis* from Zanzibar and an assessment of the underlying genetic basis. *Parasites & Vectors* 6, 343. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-343>
- Jourdain, F., Samy, A.M., Hamidi, A., Bouattour, A., Alten, B., Faraj, C., Roiz, D., Petrić, D., Pérez-Ramírez, E., Velo, E., Günay, F., Bosevska, G., Salem, I., Pajovic, I., Marić, J., Kanani, K., Paronyan, L., Dente, M.-G., Picard, M., Zgomba, M., Sarih, M., Haddad, N., Gaidash, O., Sukhiasvili, R., Declich, S., Shaibi, T., Sulesco, T., Harrat, Z., Robert, V., 2019. Towards harmonisation of entomological surveillance in the Mediterranean area. *PLoS Negl Trop Dis* 13, e0007314. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007314>
- Juárez, M.P., Pedrini, N., Girotti, J., Mijailovsky, S., 2010. Pyrethroid Resistance in Chagas Disease Vectors: The case of *Triatoma infestans* cuticle. *Resistance Pest Management* 19.
- Juárez, P., 1994. Inhibition of cuticular lipid synthesis and its effect on insect survival. *Arch Insect Biochem Physiol* 25, 177–191. <https://doi.org/10.1002/arch.940250302>
- Kakani, E.G., Sagri, E., Omirou, M., Ioannides, I.M., Mathiopoulos, K.D., 2014. Detection and geographical distribution of the organophosphate resistance-associated  $\Delta 3Q$  ace mutation in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi). *Pest Manag Sci* 70, 743–750. <https://doi.org/10.1002/ps.3564>
- Kakani, E.G., Zygouridis, N.E., Tsoumani, K.T., Seraphides, N., Zalom, F.G., Mathiopoulos, K.D., 2010. Spinosad resistance development in wild olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) populations in California. *Pest Manag Sci* 66, 447–453. <https://doi.org/10.1002/ps.1921>
- Kapatos, E., Fletcher, B.S., Pappas, S., Laudeho, Y., 1977. The release of *Opius concolor* and *O. concolor* var. *siculus* [Hym.: Braconidae] against the spring generation of *Dacus oleae* [Dipt.: Trypetidae] on Corfu. *Entomophaga* 22, 265–270. <https://doi.org/10.1007/BF02372147>
- Kapatos, E.T., Fletcher, B.S., 1984. The Phenology of the Olive Fly, *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera, Tephritidae), in Corfu. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* 97, 360–370. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1984.tb03760.x>
- Kasai, S., Caputo, B., Tsunoda, T., Cuong, T.C., Maekawa, Y., Lam-Phua, S.G., Pichler, V., Ito, K., Murota, K., Komagata, O., Yoshida, C., Chung, H.-H., Bellini, R., Tsuda, Y., Teng, H.-J., Filho, J.L. de L., Alves, L.C., Ng, L.C., Minakawa, N., Yen, N.T., Phong, T.V., Sawabe, K., Tomita, T., 2019. First detection of a Vssc allele V1016G conferring a high level of insecticide resistance in *Aedes albopictus* collected from Europe (Italy) and Asia (Vietnam), 2016: a new emerging threat to controlling arboviral diseases. *Eurosurveillance* 24, 1700847. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.5.1700847>

- Kasai, S., Komagata, O., Itokawa, K., Shono, T., Ng, L.C., Kobayashi, M., Tomita, T., 2014. Mechanisms of pyrethroid resistance in the Dengue mosquito vector, *Aedes*: Target site insensitivity, penetration, and metabolism. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 8, e2948. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002948>
- Kasai, S., Ng, L.C., Lam-Phua, S.G., Tang, C.S., Itokawa, K., Komagata, O., Kobayashi, M., Tomita, T., 2011. First detection of a putative knockdown resistance gene in major mosquito vector, *Aedes albopictus*. *Jpn J Infect Dis* 64, 217–221.
- Katsoyannos, B.I., Kouloussis, N.A., 2001. Captures of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* on spheres of different colours. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 100, 165–172. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2001.00860.x>
- Kefi, M., Balabanidou, V., Douris, V., Lycett, G., Feyereisen, R., Vontas, J., 2019. Two functionally distinct CYP4G genes of *Anopheles gambiae* contribute to cuticular hydrocarbon biosynthesis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 110, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.04.018>
- Kim, J.H., Moreau, J.A., Ali, Y., Razo, P., Hong, K.B., Yoon, K.S., Clark, J.M., 2018. RNA interference validation of detoxification genes involved in ivermectin tolerance in *Drosophila melanogaster*. *Insect Molecular Biology* 27, 651–660. <https://doi.org/10.1111/imb.12512>
- Kioulos, I., Kampouraki, A., Morou, E., Skavdis, G., Vontas, J., 2014. Insecticide resistance status in the major West Nile virus vector *Culex pipiens* from Greece. *Pest Manag Sci* 70, 623–627. <https://doi.org/10.1002/ps.3595>
- Kirst, H.A., 2010. The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research. *J Antibiot* 63, 101–111. <https://doi.org/10.1038/ja.2010.5>
- Kline, D.L., 2007. Semiochemicals, traps/targets and mass trapping technology for mosquito management. *J Am Mosq Control Assoc* 23, 241–251. [https://doi.org/10.2987/8756-971X\(2007\)23\[241:STAMTT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2987/8756-971X(2007)23[241:STAMTT]2.0.CO;2)
- Knipling, E.F., 1959. Sterile-Male Method of Population Control: Successful with some insects, the method may also be effective when applied to other noxious animals. *Science* 130, 902–904. <https://doi.org/10.1126/science.130.3380.902>
- Knipling, E.F., 1955. Possibilities of Insect Control or Eradication Through the Use of Sexually Sterile Males<sup>1</sup>. *Journal of Economic Entomology* 48, 459–462. <https://doi.org/10.1093/jee/48.4.459>
- Kumar, R., Hwang, J.-S., 2006. Larvicidal Efficiency of Aquatic Predators: A Perspective for Mosquito Biocontrol. *Zoological Studies* 45, 447–466.
- Latinović, J., Mazzaglia, A., Latinović, N., Ivanović, M., Gleason, M.L., 2013. Resistance of olive cultivars to *Botryosphaeria dothidea*, causal agent of olive fruit rot in Montenegro. *Crop Protection* 48, 35–40.
- Leong, X.-Y., Singham, G.V., Shu-Chien, A.C., Doggett, S.L., Lee, C.-Y., 2020. Influences of exposure time and mortality assessment interval on bioassay results of insecticide-resistant tropical bed bugs (Hemiptera: Cimicidae). *Insects* 11, 640. <https://doi.org/10.3390/insects11090640>
- Li, X., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 231–253. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151104>
- Liaropoulos, C., Louskas, C., Canard, M., Laudeho, Y., 1977. Lachers d' *Opius concolor* (Hym.: Braconidae) dans des populations de printemps de *Dacus*

- oleae* (Dipt.: Trypetidae). 1. experimentation en Grece continentale. Entomophaga.
- Lim, E.X.Y., Lee, W.S., Madzokere, E.T., Herrero, L.J., 2018. Mosquitoes as suitable vectors for Alphaviruses. *Viruses* 10, 84. <https://doi.org/10.3390/v10020084>
- Lin, Y., Jin, T., Zeng, L., Lu, Y., 2012. Cuticular penetration of  $\beta$ -cypermethrin in insecticide-susceptible and resistant strains of *Bactrocera dorsalis*. *Pesticide biochemistry and physiology*.
- Linton, Y., Smith, L., Koliopoulos, G., Zounos, A.K., Samanidou-Voyadjoglou, A., Patsoula, E., Harbach, R.E., 2007. The *Anopheles* (*Anopheles*) *maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) in Greece. *Journal of Natural History* 41, 2683–2699. <https://doi.org/10.1080/00222930701403255>
- Liu, N., 2015. Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. *Annu Rev Entomol* 60, 537–559. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020828>
- Lu, K., Song, Y., Zeng, R., 2021. The role of cytochrome P450-mediated detoxification in insect adaptation to xenobiotics. *Curr Opin Insect Sci* 43, 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.11.004>
- Malheiro, R., Casal, S., Baptista, P., Pereira, J.A., 2015. A review of *Bactrocera oleae* (Rossi) impact in olive products: from the tree to the table. *Trends in Food Science & Technology* 44, 226–242.
- Manikas, G., Tsiroyannis, V., 1982. Biological control of *Dacus oleae* in Greece using the parasite *Opius concolor* Szepf. Presented at the Reunion du Groupe d'Experts de la Commission des Communautés Europeennes sur l'état d'avancement des travaux des problèmes posés par la lutte intégrée en oleiculture, Antibes (France), 4-6 Nov 1981, INRA.
- Margaritopoulos, J.T., Skavdis, G., Kalogiannis, N., Nikou, D., Morou, E., Skouras, P.J., Tsitsipis, J.A., Vontas, J., 2008. Efficacy of the pyrethroid alpha-cypermethrin against *Bactrocera oleae* populations from Greece, and improved diagnostic for an iAChE mutation. *Pest Manag Sci* 64, 900–908. <https://doi.org/10.1002/ps.1580>
- Markakis, E.A., Roditakis, E.N., Kalantzakis, G.S., Chatzaki, A., Soultatos, S.K., Stavrakaki, M., Tavlaki, G.I., Koubouris, G.C., Bagkis, N., Goumas, D.E., 2021. Characterization of Fungi Associated with Olive Fruit Rot and Olive Oil Degradation in Crete, Southern Greece. *Plant Disease* 105, 3623–3635. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-20-2227-RE>
- Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M.S., Darriet, F., Bergé, J.B., Devonshire, A.L., Guillet, P., Pasteur, N., Pauron, D., 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* 7, 179–184. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.1998.72062.x>
- Martinez-Torres, D., Chevillon, C., Brun-Barale, A., Bergé, J.B., Pasteur, N., Pauron, D., 1999. Voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels in pyrethroid-resistant *Culex pipiens* L mosquitoes. *Pesticide Science* 55, 1012–1020. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199910\)55:10<1012::AID-PS39>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199910)55:10<1012::AID-PS39>3.0.CO;2-5)
- Mastrangelo, T., Welch, J.B., 2012. An Overview of the Components of AW-IPM Campaigns against the New World Screwworm. *Insects* 3, 930–955. <https://doi.org/10.3390/insects3040930>

- Mavridis, K., Fotakis, E.A., Kioulos, I., Mpellou, S., Konstantas, S., Varela, E., Gewehr, S., Diamantopoulos, V., Vontas, J., 2018a. Detection of West Nile Virus - Lineage 2 in *Culex pipiens* mosquitoes, associated with disease outbreak in Greece, 2017. *Acta Trop* 182, 64–68. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.02.024>
- Mavridis, K., Wipf, N., Müller, P., Traoré, M.M., Muller, G., Vontas, J., 2018b. Detection and Monitoring of Insecticide Resistance Mutations in *Anopheles gambiae*: Individual vs Pooled Specimens. *Genes (Basel)* 9, E479. <https://doi.org/10.3390/genes9100479>
- Melo, A.L. de A., Soccol, V.T., Soccol, C.R., 2016. *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. *Critical Reviews in Biotechnology* 36, 317–326. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.960793>
- Monastero, S., Delanoue, P., 1966. Lute biologique expérimentale contre la Mouche de l'olive (*Dacus Oleae*Gmel.) au moyen D'Opus concolorSzepl.SiculusMon. dans les iles éoliennes (sicile) en 1965. *Entomophaga* 11, 411–432. <https://doi.org/10.1007/BF02390696>
- Mouhamadou, C.S., de Souza, S.S., Fodjo, B.K., Zoh, M.G., Bli, N.K., Koudou, B.G., 2019. Evidence of insecticide resistance selection in wild *Anopheles coluzzii* mosquitoes due to agricultural pesticide use. *Infectious Diseases of Poverty* 8, 64. <https://doi.org/10.1186/s40249-019-0572-2>
- Müller, P., Warr, E., Stevenson, B.J., Pignatelli, P.M., Morgan, J.C., Steven, A., Yawson, A.E., Mitchell, S.N., Ranson, H., Hemingway, J., Paine, M.J.I., Donnelly, M.J., 2008. Field-caught permethrin-resistant *Anopheles gambiae* overexpress CYP6P3, a P450 that metabolises pyrethroids. *PLoS Genet* 4, e1000286. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000286>
- Nardi, F., Carapelli, A., Dallai, R., Roderick, G.K., Frati, F., 2005. Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). *Molecular Ecology* 14, 2729–2738. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02610.x>
- Nestel, D., Rempoulakis, P., Yanovski, L., Miranda, M.A., Papadopoulos, N.T., 2016. The Evolution of Alternative Control Strategies in a Traditional Crop: Economy and Policy as Drivers of Olive Fly Control, in: Horowitz, A.R., Ishaaya, I. (Eds.), *Advances in Insect Control and Resistance Management*. Springer International Publishing, Cham, pp. 47–76. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-31800-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-31800-4_4)
- Neuenschwander, P., Michelakis, S., 1979. Determination of the lower thermal thresholds and day-degree requirements for eggs and larvae of *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera: Tephritidae) under field conditions in Crete, Greece. *Mitteilungen. Bulletin*.
- Noppun, V., Saito, T., Miyata, T., 1989. Cuticular penetration of S-fenvalerate in fenvalerate-resistant and susceptible strains of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 33, 83–87. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(89\)90079-5](https://doi.org/10.1016/0048-3575(89)90079-5)
- NPHO, 2020a. Annual epidemiological report for West Nile virus human infection, Greece, 2020. [WWW Document]. URL [https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2020/09/WNV\\_annual\\_report\\_2020\\_ENG.pdf](https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2020/09/WNV_annual_report_2020_ENG.pdf)
- NPHO, 2020b. Annual Epidemiological Surveillance Report, Malaria in Greece, 2020. [WWW Document]. URL [https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/01/MALARIA\\_ANNUAL\\_REPORT\\_2020\\_ENG.pdf](https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/01/MALARIA_ANNUAL_REPORT_2020_ENG.pdf)

- NPHO, 2019. Malaria in Greece Annual Report (2019) [WWW Document]. URL [https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/01/Malaria\\_Annual\\_Report\\_2019\\_ENG.pdf](https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/01/Malaria_Annual_Report_2019_ENG.pdf)
- Ollerton, J., Winfree, R., Tarrant, S., 2011. How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120, 321–326. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x>
- Ottesen, E.A., 2006. Lymphatic filariasis: Treatment, control and elimination. *Adv Parasitol* 61, 395–441. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(05\)61010-X](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(05)61010-X)
- Panini, M., Manicardi, G.C., Moores, G.D., Mazzoni, E., 2016. An overview of the main pathways of metabolic resistance in insects. *Invertebrate Survival Journal* 13, 326–335. <https://doi.org/10.25431/1824-307X/isj.v13i1.326-335>
- Patsoula, E., Beleri, S., Tegos, N., Mkrtisian, R., Vakali, A., Pervanidou, D., 2020. Entomological Data and Detection of West Nile Virus in Mosquitoes in Greece (2014-2016), Before Disease Re-Emergence in 2017. *Vector Borne Zoonotic Dis* 20, 60–70. <https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2422>
- Patsoula, E., Samanidou-Voyadjoglou, A., Spanakos, G., Kremastinou, J., Nasioulas, G., Vakalis, N.C., 2007. Molecular characterization of the *Anopheles maculipennis* complex during surveillance for the 2004 Olympic Games in Athens. *Med Vet Entomol* 21, 36–43. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2007.00669.x>
- Patsoula, E., Samanidou-Voyadjoglou, A., Spanakos, G., Kremastinou, J., Nasioulas, G., Vakalis, N.C., 2006. Molecular and morphological characterization of *Aedes albopictus* in northwestern Greece and differentiation from *Aedes cretinus* and *Aedes*. *J Med Entomol* 43, 40–54. <https://doi.org/10.1093/jmedent/43.1.40>
- Pavlidis, N., Gioti, A., Wybouw, N., Dermauw, W., Ben-Yosef, M., Yuval, B., Jurkevich, E., Kampouraki, A., Van Leeuwen, T., Vontas, J., 2017. Transcriptomic responses of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* and its symbiont *Candidatus Erwinia dacicola* to olive feeding. *Sci Rep* 7, 42633. <https://doi.org/10.1038/srep42633>
- Pavlidis, N., Kampouraki, A., Tseliou, V., Wybouw, N., Dermauw, W., Roditakis, E., Nauen, R., Van Leeuwen, T., Vontas, J., 2018a. Molecular characterization of pyrethroid resistance in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Pestic Biochem Physiol* 148, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.03.011>
- Pavlidis, N., Vontas, J., Van Leeuwen, T., 2018b. The role of glutathione S-transferases (GSTs) in insecticide resistance in crop pests and disease vectors. *Current Opinion in Insect Science, Pests and resistance \* Behavioural ecology* 27, 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.04.007>
- Pedrini, N., Mijailovsky, S.J., Girotti, J.R., Stariolo, R., Cardozo, R.M., Gentile, A., Juárez, M.P., 2009. Control of Pyrethroid-Resistant Chagas Disease Vectors with Entomopathogenic Fungi. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 3, e434. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000434>
- Pereira-Dos-Santos, T., Roiz, D., Lourenço-de-Oliveira, R., Paupy, C., 2020. A Systematic Review: Is *Aedes albopictus* an Efficient Bridge Vector for Zoonotic Arboviruses? *Pathogens* 9, E266. <https://doi.org/10.3390/pathogens9040266>
- Petacchi, R., Zunin, P., Evangelisti, F., Tiscomia, E., 1994. Relation between *Bactrocera oleae* (gmel.) infestation and oil chemical composition: results of two-year trials in an eastern ligurian olive grove. *Acta Hortic.* 395–398. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1994.356.84>

- Petersen, L.R., Brault, A.C., Nasci, R.S., 2013. West Nile virus: review of the literature. *JAMA* 310, 308–315. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.8042>
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pinheiro, L.A., Dáder, B., Wanumen, A.C., Pereira, J.A., Santos, S.A.P., Medina, P., 2020. Side Effects of pesticides on the plive fruit fly parasitoid *Psyttalia concolor* (Szépligeti): A review. *Agronomy* 10, 1755. <https://doi.org/10.3390/agronomy10111755>
- Porretta, D., Fotakis, E.A., Mastrantonio, V., Chaskopoulou, A., Michaelakis, A., Kioulos, I., Weill, M., Urbanelli, S., Vontas, J., Bellini, R., 2019. Focal distribution of diflubenzuron resistance mutations in *Culex pipiens* mosquitoes from Northern Italy. *Acta Trop* 193, 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.02.024>
- Prokopy, R.J., Economopoulos, A.P., McFADDEN, M.W., 1975. Attraction of Wild and Laboratory-Cultured *Dacus Oleae* Flies to Small Rectangles of Different Hues, Shades, and Tints. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 18, 141–152. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1975.tb02364.x>
- Raghavendra, K., Barik, T.K., Reddy, B.P.N., Sharma, P., Dash, A.P., 2011. Malaria vector control: from past to future. *Parasitol Res* 108, 757–779. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2232-0>
- Ranson, H., 2017. Current and future prospects for preventing malaria transmission via the use of insecticides. *Cold Spring Harb Perspect Med* 7, a026823. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026823>
- Ranson, H., Jensen, B., Vulule, J.M., Wang, X., Hemingway, J., Collins, F.H., 2000. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol Biol* 9, 491–497. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2000.00209.x>
- Ranson, H., Lissenden, N., 2016. Insecticide Resistance in African *Anopheles* mosquitoes: A worsening situation that needs urgent action to maintain malaria control. *Trends Parasitol* 32, 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.11.010>
- Reid, M.C., McKenzie, F.E., 2016. The contribution of agricultural insecticide use to increasing insecticide resistance in African malaria vectors. *Malaria Journal* 15, 107. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1162-4>
- Rinkevich, F.D., Du, Y., Dong, K., 2013. Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. *Pestic Biochem Physiol* 106, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.02.007>
- Rivero, A., Vézilier, J., Weill, M., Read, A.F., Gandon, S., 2010. Insecticide control of vector-borne diseases: When Is Insecticide Resistance a Problem? *PLOS Pathogens* 6, e1001000. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001000>
- Riveron, J.M., Tchouakui, M., Mugenzi, L., Menze, B.D., Chiang, M.-C., Wondji, C.S., 2018. Insecticide resistance in malaria vectors: An update at a global scale, in: Manguin, S., Dev, V. (Eds.), *Towards Malaria Elimination - A Leap Forward*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.78375>
- Robert, V., Günay, F., Le Goff, G., Bousès, P., Sulesco, T., Khalin, A., Medlock, J., Kampen, H., Petrić, D., Schaffner, F., 2019. Distribution chart for Euro-Mediterranean mosquitoes (western Palaearctic region). *Journal of the European Mosquito Control Association* 37, 1–28.



- Robinson, A.S., 2005. Genetic Basis of the Sterile Insect Technique, in: Dyck, V.A., Hendrichs, J., Robinson, A.S. (Eds.), *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 95–114. [https://doi.org/10.1007/1-4020-4051-2\\_4](https://doi.org/10.1007/1-4020-4051-2_4)
- Roditakis, E., Gris pou, M., Morou, E., Kristoffersen, J.B., Roditakis, N., Nauen, R., Vontas, J., Tsagkarakou, A., 2009. Current status of insecticide resistance in Q biotype *Bemisia tabaci* populations from Crete. *Pest Manag Sci* 65, 313–322. <https://doi.org/10.1002/ps.1690>
- Roiz, D., Wilson, A.L., Scott, T.W., Fonseca, D.M., Jourdain, F., Müller, P., Velayudhan, R., Corbel, V., 2018. Integrated *Aedes* management for the control of *Aedes*-borne diseases. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 12, e0006845. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006845>
- Roos, R., 2007. Chikungunya fever gains foothold in Europe [WWW Document]. CIDRAP. URL <https://www.cidrap.umn.edu/news-perspective/2007/09/chikungunya-fever-gains-foothold-europe> (accessed 8.1.21).
- Rouault, J.-D., Marican, C., Wicker-Thomas, C., Jallon, J.-M., 2004. Relations between cuticular hydrocarbon (HC) polymorphism, resistance against desiccation and breeding temperature; a model for HC evolution in *D. melanogaster* and *D. simulans*, in: Capy, P., Gibert, P., Boussy, I. (Eds.), *Drosophila melanogaster, Drosophila simulans: So similar, so different, contemporary issues in genetics and evolution*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 195–212. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-0965-2\\_16](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0965-2_16)
- Sagri, E., Reczko, M., Gregoriou, M.-E., Tsoumani, K.T., Zygouridis, N.E., Salpea, K.D., Zalom, F.G., Ragoussis, J., Mathiopoulos, K.D., 2014. Olive fly transcriptomics analysis implicates energy metabolism genes in spinosad resistance. *BMC Genomics* 15, 714. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-714>
- Samantsidis, G.-R., Panteleri, R., Denecke, S., Kounadi, S., Christou, I., Nauen, R., Douris, V., Vontas, J., 2020. ‘What I cannot create, I do not understand’: functionally validated synergism of metabolic and target site insecticide resistance. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 287, 20200838. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.0838>
- Sauphanor, B., Brosse, V., Bouvier, J.C., Speich, P., Micoud, A., Martinet, C., 2000. Monitoring resistance to diflubenzuron and deltamethrin in French codling moth populations (*Cydia pomonella*). *Pest Management Science* 56, 74–82. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1526-4998\(200001\)56:1<74::AID-PS96>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1526-4998(200001)56:1<74::AID-PS96>3.0.CO;2-C)
- Scott, J.G., 1990. Investigating mechanisms of insecticide resistance: methods, strategies, and pitfalls, in: Roush, R.T., Tabashnik, B.E. (Eds.), *Pesticide Resistance in Arthropods*. Springer US, Boston, MA, pp. 39–57. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6429-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6429-0_3)
- Scott, J.G., Yoshimizu, M.H., Kasai, S., 2015. Pyrethroid resistance in *Culex pipiens* mosquitoes. *Pestic Biochem Physiol* 120, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.12.018>
- Sinno, M., Bézier, A., Vinale, F., Giron, D., Laudonia, S., Garonna, A.P., Pennacchio, F., 2020. Symbiosis disruption in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi), as a potential tool for sustainable control. *Pest Management Science* 76, 3199–3207. <https://doi.org/10.1002/ps.5875>

- Skouras, P.J., Margaritopoulos, J.T., Seraphides, N.A., Ioannides, I.M., Kakani, E.G., Mathiopoulos, K.D., Tsitsipis, J.A., 2007. Organophosphate resistance in olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, populations in Greece and Cyprus. *Pest Manag Sci* 63, 42–48. <https://doi.org/10.1002/ps.1306>
- Smith, J.L., Fonseca, D.M., 2004. Rapid assays for identification of members of the *Culex* (*Culex*) *pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: culicidae). *Am J Trop Med Hyg* 70, 339–345.
- Snellings, Y., Herrera, B., Wildemann, B., Beelen, M., Zwarts, L., Wenseleers, T., Callaerts, P., 2018. The role of cuticular hydrocarbons in mate recognition in *Drosophila suzukii*. *Sci Rep* 8, 4996. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23189-6>
- Soko, W., Chimbari, M.J., Mukaratirwa, S., 2015. Insecticide resistance in malaria-transmitting mosquitoes in Zimbabwe: a review. *Infectious Diseases of Poverty* 4, 46. <https://doi.org/10.1186/s40249-015-0076-7>
- Sparks, T.C., Nauen, R., 2015. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pestic Biochem Physiol* 121, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.11.014>
- Stavraki-Paulopoulou, H., Sciences, U. de P. (FRA) F. des, 1965. Contribution à l'étude de la capacité reproductrice et de la fécondité d'*Opius concolor* szep.
- Sternberg, E.D., Thomas, M.B., 2017. Insights from agriculture for the management of insecticide resistance in disease vectors. *Evol Appl* 11, 404–414. <https://doi.org/10.1111/eva.12501>
- Stevenson, B.J., Bibby, J., Pignatelli, P., Muangnoicharoen, S., O'Neill, P.M., Lian, L.-Y., Müller, P., Nikou, D., Steven, A., Hemingway, J., Sutcliffe, M.J., Paine, M.J.I., 2011. Cytochrome P450 6M2 from the malaria vector *Anopheles gambiae* metabolizes pyrethroids: Sequential metabolism of deltamethrin revealed. *Insect Biochem Mol Biol* 41, 492–502. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.003>
- Stork, N.E., 2018. How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on earth? *Annu. Rev. Entomol.* 63, 31–45. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043348>
- Strycharz, J.P., Lao, A., Li, H., Qiu, X., Lee, S.H., Sun, W., Yoon, K.S., Doherty, J.J., Pittendrigh, B.R., Clark, J.M., 2013. Resistance in the highly DDT-resistant 91-R strain of *Drosophila melanogaster* involves decreased penetration, increased metabolism, and direct excretion. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 107, 207–217. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.06.010>
- Tabashnik, B.E., Mota-Sanchez, D., Whalon, M.E., Hollingworth, R.M., Carrière, Y., 2014. Defining Terms for Proactive Management of Resistance to Bt Crops and Pesticides. *Journal of Economic Entomology* 107, 496–507. <https://doi.org/10.1603/EC13458>
- Takken, W., Snellen, W.B., Verhave, J.P., Knols, B.G.J., Atmosoedjono, S., 1990. Environmental measures for malaria control in Indonesia. A historical review on species sanitation. Agricultural University.
- Taskin, B.G., Dogaroglu, T., Kilic, S., Dogac, E., Taskin, V., 2016. Seasonal dynamics of insecticide resistance, multiple resistance, and morphometric variation in field populations of *Culex pipiens*. *Pestic Biochem Physiol* 129, 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.10.012>
- Thomas, D.B., Mangan, R.L., 2005. Nontarget impact of spinosad GF-120 bait sprays for control of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) in Texas citrus. *Journal*

- of Economic Entomology 98, 1950–1956. <https://doi.org/10.1093/jee/98.6.1950>
- Tijet, N., Helvig, C., Feyereisen, R., 2001. The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene* 262, 189–198. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(00\)00533-3](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(00)00533-3)
- Toé, K.H., N'Falé, S., Dabiré, R.K., Ranson, H., Jones, C.M., 2015. The recent escalation in strength of pyrethroid resistance in *Anopheles coluzzi* in West Africa is linked to increased expression of multiple gene families. *BMC Genomics* 16, 146. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1342-6>
- Torrini, G., Mazza, G., Benvenuti, C., Simoncini, S., Landi, S., Frosinini, R., Rocchini, A., Roversi, P.F., 2020. Entomopathogenic nematodes as potential biocontrol agents against *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *Biocontrol Science and Technology* 30, 909–919. <https://doi.org/10.1080/09583157.2020.1775177>
- Tsakireli, D., Riga, M., Kounadi, S., Douris, V., Vontas, J., 2019. Functional characterization of CYP6A51, a cytochrome P450 associated with pyrethroid resistance in the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata*. *Pestic Biochem Physiol* 157, 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.03.022>
- Tsitsipis, J. a, 1977. Effect of constant temperature on the eggs of the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Diptera, Tephritidae). *Annales de Zoologie Ecologie Animale*.
- Tsitsipis, J.A., 1980. Effect of constant temperatures on larval and pupal development of olive fruit flies reared on artificial diet. *Environmental Entomology* 9, 764–768. <https://doi.org/10.1093/ee/9.6.764>
- Tunaz, H., Uygun, N., 2004. Insect growth regulators for insect pest control\*. *Turk J Agric For* 28, 377–387.
- Van Dam, A.R., Walton, W.E., 2007. Comparison of mosquito control provided by the arroyo chub (*Gila orcutti*) and the mosquitofish (*Gambusia affinis*). *J Am Mosq Control Assoc* 23, 430–441. <https://doi.org/10.2987/5620.1>
- Van Leeuwen, T., Dermauw, W., Mavridis, K., Vontas, J., 2020. Significance and interpretation of molecular diagnostics for insecticide resistance management of agricultural pests. *Curr Opin Insect Sci* 39, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.03.006>
- Vargas-Terán, M., Hofmann, H.C., Tweddle, N.E., 2005. Impact of screwworm eradication programmes using the sterile insect technique, in: Dyck, V.A., Hendrichs, J., Robinson, A.S. (Eds.), *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 629–650. [https://doi.org/10.1007/1-4020-4051-2\\_24](https://doi.org/10.1007/1-4020-4051-2_24)
- Vontas, J., David, J.-P., Nikou, D., Hemingway, J., Christophides, G.K., Louis, C., Ranson, H., 2007. Transcriptional analysis of insecticide resistance in *Anopheles stephensi* using cross-species microarray hybridization. *Insect Mol Biol* 16, 315–324. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2007.00728.x>
- Vontas, J., Grigoraki, L., Morgan, J., Tsakireli, D., Fuseini, G., Segura, L., Carvalho, J.N. de, Nguema, R., Weetman, D., Slotman, M.A., Hemingway, J., 2018. Rapid selection of a pyrethroid metabolic enzyme CYP9K1 by operational malaria control activities. *PNAS* 115, 4619–4624. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719663115>
- Vontas, J., Hernández-Crespo, P., Margaritopoulos, J.T., Ortego, F., Feng, H.-T., Mathiopoulos, K.D., Hsu, J.-C., 2011. Insecticide resistance in Tephritid flies. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 100, 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.04.004>

- Vontas, J., Katsavou, E., Mavridis, K., 2020. Cytochrome P450-based metabolic insecticide resistance in *Anopheles* and *Aedes* mosquito vectors: Muddying the waters. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 170, 104666. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104666>
- Vontas, J., Mavridis, K., 2019. Vector population monitoring tools for insecticide resistance management: Myth or fact? *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Special issue: 2018 INSTAR Summit 161, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.08.005>
- Vu, S.N., Nguyen, T.Y., Tran, V.P., Truong, U.N., Le, Q.M., Le, V.L., Le, T.N., Bektas, A., Briscoe, A., Aaskov, J.G., Ryan, P.A., Kay, B.H., 2005. Elimination of dengue by community programs using *Mesocyclops* (Copepoda) against *Aedes* in central Vietnam. *Am J Trop Med Hyg* 72, 67–73.
- Vulule, J.M., Beach, R.F., Atieli, F.K., McAllister, J.C., Brogdon, W.G., Roberts, J.M., Mwangi, R.W., Hawley, W.A., 1999. Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin-impregnated nets. *Med Vet Entomol* 13, 239–244. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.1999.00177.x>
- Wan, C., Hao, Z., Feng, X., 2016. Structures, properties, and energy-storage mechanisms of the semi-lunar process cuticles in locusts. *Sci Rep* 6, 35219. <https://doi.org/10.1038/srep35219>
- Wang, Jing-Jing, Wei, D., Dou, W., Hu, F., Liu, W.-F., Wang, Jin-Jun, 2013. Toxicities and synergistic effects of several insecticides against the oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae). *J Econ Entomol* 106, 970–978. <https://doi.org/10.1603/ec12434>
- Watson, G.B., Chouinard, S.W., Cook, K.R., Geng, C., Gifford, J.M., Gustafson, G.D., Hasler, J.M., Larrinua, I.M., Letherer, T.J., Mitchell, J.C., Pak, W.L., Salgado, V.L., Sparks, T.C., Stilwell, G.E., 2010. A spinosyn-sensitive *Drosophila melanogaster* nicotinic acetylcholine receptor identified through chemically induced target site resistance, resistance gene identification, and heterologous expression. *Insect Biochem Mol Biol* 40, 376–384. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.11.004>
- Weill, M., Lutfalla, G., Mogensen, K., Chandre, F., Berthomieu, A., Berticat, C., Pasteur, N., Philips, A., Fort, P., Raymond, M., 2003. Comparative genomics: Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature* 423, 136–137. <https://doi.org/10.1038/423136b>
- WHO, 2021a. Fact sheet about Malaria [WWW Document]. URL <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria> (accessed 7.30.21).
- WHO, 2021b. Dengue and severe dengue [WWW Document]. URL <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> (accessed 7.30.21).
- WHO, 2020a. Vector-borne diseases [WWW Document]. URL <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases> (accessed 7.27.21).
- WHO, 2020b. World malaria report 2020. 20 years of global progress & challenges [WWW Document]. URL <https://www.who.int/publications/i/item/9789240015791>
- WHO, 2018a. Zika virus [WWW Document]. URL <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus> (accessed 7.30.21).

- WHO, 2018b. WHO recommended insecticides for indoor residual spraying against malaria vectors [WWW Document]. URL [https://www.who.int/neglected\\_diseases/vector\\_ecology/vector-control/Insecticides\\_IRS\\_22\\_September\\_2018.pdf?ua=1](https://www.who.int/neglected_diseases/vector_ecology/vector-control/Insecticides_IRS_22_September_2018.pdf?ua=1) (accessed 7.30.21).
- WHO, 2016. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. World Health Organization.
- WHO, 2014. A global brief on vector-borne diseases.
- WHO, 2013. Larval Source Management: a supplementary measure for malaria vector control [WWW Document]. URL [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85379/9789241505604\\_eng.pdf?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85379/9789241505604_eng.pdf?sequence=1) (accessed 7.30.21).
- WHO (Ed.), 2012. Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WHO, 1998. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces [WWW Document]. URL [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/64879/WHO\\_CDS\\_CPC\\_MAL\\_98.12.pdf?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/64879/WHO_CDS_CPC_MAL_98.12.pdf?sequence=1)
- WHO (Ed.), 1990. Equipment for vector control, 3rd ed. ed. World Health Organization, Geneva.
- WHO (Ed.), 1982. Manual on environmental management for mosquito control: with special emphasis on malaria vectors, WHO offset publication. World Health Organization ; WHO Publications Centre USA, distributor], Geneva : [Albany, N.Y.
- WHO, W.H.O.G.M., 2006. Indoor residual spraying : use of indoor residual spraying for scaling up global malaria control and elimination : WHO position statement.
- WHO, W.H.O.R.O. for S.-E., 2005. Regional strategic framework for scaling up the use of insecticide-treated nets.
- Wood, O.R., Hanrahan, S., Coetzee, M., Koekemoer, L.L., Brooke, B.D., 2010. Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Parasites & Vectors* 3, 67. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-67>
- Wu, C.W., Kong, X.Q., Wu, D., 2007. Micronanostructures of the scales on a mosquito's legs and their role in weight support. *Phys. Rev. E* 76, 017301. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.76.017301>
- Wu, P., Yu, X., Wang, P., Cheng, G., 2019. Arbovirus lifecycle in mosquito: acquisition, propagation and transmission. *Expert Rev Mol Med* 21, e1. <https://doi.org/10.1017/erm.2018.6>
- Yang, L.H., Gratton, C., 2014. Insects as drivers of ecosystem processes. *Curr Opin Insect Sci* 2, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.06.004>
- Yergolkar, P.N., Tandale, B.V., Arankalle, V.A., Sathe, P.S., Sudeep, A.B., Gandhe, S.S., Gokhle, M.D., Jacob, G.P., Hundekar, S.L., Mishra, A.C., 2006. Chikungunya outbreaks caused by African genotype, India. *Emerg Infect Dis* 12, 1580–1583. <https://doi.org/10.3201/eid1210.060529>
- Yu, S.J., 2011. The toxicology and biochemistry of insecticides. CRC Press, Boca Raton. <https://doi.org/10.1201/9781420059762>

- Zhang, B., Xue, H.-J., Song, K.-Q., Liu, J., Li, W.-Z., Nie, R.-E., Yang, X.-K., 2014. Male mate recognition via cuticular hydrocarbons facilitates sexual isolation between sympatric leaf beetle sister species. *J Insect Physiol* 70, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.08.006>
- ΕΟΔΥ, 2018. Τα κουνούπια και η αντιμετώπισή τους [WWW Document]. URL [https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2018/12/programma\\_katapolemisis\\_kounoupiwn.pdf](https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2018/12/programma_katapolemisis_kounoupiwn.pdf)
- Κιούλος, Η., 2014. Μελέτη της ανθεκτικότητας των κουνουπιών σε σκευάσματα που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμησή τους στην Ελλάδα. Διδακτορική Διατριβή. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- ΥΠΑΑΤ, 2021. Κατάλογοι φυτοπροστατευτικών προϊόντων και βιοκτόνων [WWW Document]. Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων. URL <https://1click.minagric.gr/oneClickUI/frmFytoPro.zul>

# CV

<b>Προσωπικά στοιχεία</b>	
<b>Αναστασία Καμπουράκη</b>	
✉ <a href="mailto:kampouraki.an@gmail.com">kampouraki.an@gmail.com</a>	
☎ (+30) 6976404919	
ORCID iD <a href="https://orcid.org/0000-0001-6702-2544">https://orcid.org/0000-0001-6702-2544</a>	
<b>Σύντομη περιγραφή</b>	
<p>Γεωπόνος-Βιοτεχνολόγος με πολυετή εμπειρία στη συμμετοχή σε ερευνητικά προγράμματα. Ένα μεγάλο κομμάτι της ερευνητικής μου εμπειρίας και των επιστημονικών ενδιαφερόντων μου αφορά το δάκο της ελιάς και τα κουνούπια-φορείς ασθενειών. Διαθέτω μεγάλη εμπειρία στην εκτροφή-συντήρηση εντόμων, κυρίως στο δάκο και σε κουνούπια, στην εφαρμογή και ανάλυση τοξικολογικών δοκιμών στα ίδια έντομα, στην εφαρμογή μοριακών διαγνωστικών μεθόδων και στην εφαρμογή της τεχνολογίας RNAi σίγησης. Η διδακτορική μου διατριβή, αφορά επίσης το δάκο της ελιάς και κουνούπια-φορείς ασθενειών, με αντικείμενο την παρακολούθηση της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα και διερεύνηση των μηχανισμών της. Στο πλαίσιο της διδακτορικής διατριβής μου συνεργάστηκα με κρατικούς φορείς που σχετίζονται με το πρόγραμμα δακοκτονίας και επιστημονικά προγράμματα που σχετίζονται με τη διαχείριση του δάκου της ελιάς. Έχω 9 δημοσιεύσεις σε έγκριτα διεθνή περιοδικά.</p>	
<b>Εκπαίδευση</b>	
2016-σήμερα	Υποψήφια διδάκτορας στο Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, με επιβλέποντα τον καθηγητή Βόντα Ι.
2010-2012	Πανεπιστήμιο Κρήτης   Τμήμα Βιολογίας   Μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών: Περιβαλλοντική Βιολογία – Διαχείριση Χερσαίων και Θαλάσσιων Βιολογικών Πορων
2003-2010	Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών   Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας
<b>Εργασιακή εμπειρία</b>	
01/06/2020 – 31/04/2021	Στο Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Παν/μίου Αθηνών. Συμμετοχή στο ερευνητικό πρόγραμμα: Οι Δρόμοι της ελιάς. Υπόεργο II.

04/08/2017 – 31/05/2020	<p>Στο Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Παν/μίου Αθηνών. Πραγματοποίηση ερευνητικών εργασιών στο πλαίσιο της υποτροφίας με τίτλο: Μοριακή ανάλυση μηχανισμών ανθεκτικότητας εντόμων υγειονομικής σημασίας και εχθρών καλλιεργειών στα εντομοκτόνα-1<sup>η</sup> Προκύρηξη Υποτροφιών ΕΛΙΔΕΚ.</p>
01/04/2017 – 31/03/2018	<p>Στο Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB) του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ). Συμμετοχή στο Ευρωπαϊκό ερευνητικό πρόγραμμα INFRAVEC-GA731060,</p>
01/01/2017 – 31/03/2017	<p>Στο Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB) του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ). Συμμετοχή στο ερευνητικό πρόγραμμα/συμφωνία: BAYER AG.</p>
09/05/2016 – 08/11/2016	<p>Στον Ελληνικό Γεωργικό Οργανισμό – ΔΗΜΗΤΡΑ (ΕΛΓΟ - ΔΗΜΗΤΡΑ) – Ινστιτούτο Ελιάς, Υποτροπικών Φυτών και Αμπέλου / Τμήμα Αμπέλου Λαχανοκομίας, Ανθοκομίας και Φυτοπροστασίας Ηρακλείου. Συμμετοχή στο ερευνητικό πρόγραμμα με τίτλο «Explanation of the good results against virus transmission by investigating the effects of flupyradifurone on adults and nymphs of white fly BEMITA and determining the persistence».</p>
01/03/2016 – 31/12/2016	<p>Στο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Κρήτης με συμμετοχή στο έργο: A novel smart trap station as an Internet of Things surveillance solution to remotely count and identify the species of disease-carrying mosquitoes – REMOSIS.</p>
01/03/2016 – 31/12/2016	<p>Στο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Κρήτης με συμμετοχή στο έργο: Entomatic, Novel automatic and stand-alone integrated pest management tool form remote count and bioacoustics identification of the Olive fly (<i>Bactrocera oleae</i>) in the field.</p>
07/01/2015 – 31/12/2015 & 05/04/2017 – 15/06/2017	<p>Στο Εργαστήριο Μοριακής Εντομολογίας του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Συμμετοχή στο ερευνητικό πρόγραμμα: Γενωμική προσέγγιση για την κατανόηση των μηχανισμών αποτοξικοποίησης των ξενοβιοτικών και της προσαρμογής του δάκου στον ελαιόκαρπο.</p>
01/08/2014 – 31/05/2015	<p>Στο Εργαστήριο Μοριακής Εντομολογίας του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Συμμετοχή στο ερευνητικό πρόγραμμα: Θαλής-Παν/μιο Κρήτης - Γενωμική και λειτουργική προσέγγιση για την κατανόηση</p>



<p>01/02/2013 – 31/08/2013</p> <p>01/09/2012 – 15/12/2012 &amp; 01/02/2014 – 31/01/2015</p> <p>15/06/2012 – 15/08/2012</p>	<p>της ανθεκτικότητας εντόμων και ακάρεων γεωπονικού ενδιαφέροντος στα εντομοκτόνα.</p> <p>Στο Εργαστήριο Μοριακής Εντομολογίας του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Συμμετοχή σε ερευνητικά προγράμματα: African Vector Control: New Tools 265660,</p> <p>Τρίμηνη Πρακτική άσκηση (Erasmus) στο Liverpool School of Tropical Medicine.</p>
<p><b>Επαγγελματικές δεξιότητες</b></p>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Μοριακές τεχνικές</b> ( PCR, Real Time PCR, semi-qPCR, Multiplex PCR, PCR-RFLP, Long-PCR, cloning, RNA/DNA extraction, cDNA synthesis)</li> <li>▪ <b>Πρωτεϊνικές τεχνικές</b> (Έκφραση, απομόνωση και χαρακτηρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, Διαχωρισμός πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και ανοσοαποτύπωση κατά Western)</li> <li>▪ <b>Μικροσκοπία Προετοιμασία ιστών και εξέτασή τους σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM)</b></li> <li>▪ <b>Συντήρηση πληθυσμών εντόμων και ακάρεων</b> (δάκος, κουνούπι, αλευρώδης, τετράνυχος, πράσινο σκουλήκι)</li> <li>▪ <b>Τοξικολογικές δοκιμές σε έντομα και ακάρεια</b> (δάκος, κουνούπι, αλευρώδης, πράσινο σκουλήκι)</li> <li>▪ <b>Άλλες τεχνικές:</b> RNA σίγηση σε ενήλικα άτομα δάκου, κουνουπιών, και προνύμφες πράσινου σκουληκιού, Ανοσοϊστοχημεία σε κρυστομές, Απομόνωση και μέτρηση ραδιενεργού εντομοκτόνου σε κουνούπια, Απομόνωση λιπιδίων με οργανικό διαλύτη και χρωματογραφική ανάλυση υδρογονανθράκων (Thin Layer Chromatography)</li> </ul>	
<p><b>Ψηφιακές δεξιότητες</b></p>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ καλός χειρισμός του Office (επεξεργασία κειμένου, λογιστικά φύλλα, παρουσιάσεις)</li> <li>▪ καλός χειρισμός των λογισμικών ImageJ, Photoshop, Polo plus, IBM Spss statistics, GraphPad</li> </ul>	
<p><b>Γλώσσες</b></p>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ελληνικά: μητρική γλώσσα</li> <li>▪ Αγγλικά: First Certificate in English (University of Cambridge)</li> </ul>	

## Υποτροφίες-Χρηματοδοτήσεις

- Υποτροφία υποψήφιου διδάκτορα από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛΙΔΕΚ)

## Δημοσιεύσεις σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά

- Frances Blow, Anastasia Gioti, Ian B Goodhead, Maria Kalyva, **Anastasia Kampouraki**, John Vontas, Alistair C Darby, Functional Genomics of a Symbiotic Community: Shared Traits in the Olive Fruit Fly Gut Microbiota, *Genome Biology and Evolution*, Volume 12, Issue 2, February 2020, Pages 3778–3791, <https://doi.org/10.1093/gbe/evz258>
- Vasileia Balabanidou, Mary Kefi, Michalis Aivaliotis, Venetia Koidou, Juan R. Girotti, Sergio J. Mijailovsky, M. Patricia Juárez, Eva Papadogiorgaki, George Chalepakis, **Anastasia Kampouraki**, Christoforos Nikolaou, Hilary Ranson and John Vontas (2019) Mosquitoes cloak their legs to resist insecticides *Proc. R. Soc. B* 286:20191091 <http://doi.org/10.1098/rspb.2019.1091>
- **Anastasia Kampouraki**, Marianna Stavrakaki, Aggeliki Karataraki, Georgios Katsikogiannis, Evanthia Pitika, Kiriaki Varikou, Antonia Vlachaki, Antonios Chrysargyris, Eleni Malandraki, Nikolaos Sidiropoulos, Antonios Paraskevopoulos, Dimitra Gkilpathi, Emmanouil Roditakis, John Vontas (2018) *Recent evolution and operational impact of insecticide resistance in olive fruit fly *Bactrocera oleae* populations from Greece*. *Journal of Pest Science*, 91: 1429, <https://doi.org/10.1007/s10340-018-1007-8>
- Nena Pavlidi, **Anastasia Kampouraki**, Vasilis Tseliou, Nicky Wybouw, Wannes Dermauw, Emmanouil Roditakis, Ralf Nauen, Thomas Van Leeuwen, John Vontas (2018) *Molecular characterization of pyrethroid resistance in the olive fruit fly *Bactrocera oleae**. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 148: 1-7 <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.03.011>
- Nena Pavlidi, Anastasia Gioti, Nicky Wybouw, Wannes Dermauw, Michael Ben-Yosef Boaz Yuval, Edouard Jurkevich, **Anastasia Kampouraki**, Thomas Van Leeuwen, and John Vontas (2017) *Transcriptomic responses of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* and its symbiont *Candidatus Erwinia dacicola* to olive feeding*. *Scientific Reports*. 2017;7:42633, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003771>
- Ben Longdon, Jonathan P Day, Nora Schulz, Philip T Leftwich, Maaïke A de Jong, Casper J Breuker, Melanie Gibbs, Darren J Obbard, Lena Wilfert, Sophia CL Smith, John E McGonigle, Thomas M Houslay, Lucy I Wright, Luca Livraghi, Luke C Evans, Lucy A Friend, Tracey Chapman, John Vontas, **Natasa Kambouraki**, Francis M Jiggins (2017) *Vertically transmitted rhabdoviruses are found across three insect families and have dynamic interactions with their hosts*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, p. 284, <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.2381>
- Vasileia Balabanidou, **Anastasia Kampouraki**, Marina MacLean, Gary J. Blomquist, Claus Tittiger, M. Patricia Juárez, Sergio J. Mijailovsky, George Chalepakis, Amalia Anthousi, Amy Lynd, Sanou Antoine, Janet Hemingway, Hilary Ranson, Gareth J. Lycett, and John Vontas (2016) *Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae**. *Proc Natl Acad Sci U S A*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608295113>
- Linda Grigoraki, Jacques Lagnel, Ilias Kioulos, **Anastasia Kampouraki**, Evangelia Morou, Pierrick Labbé, Mylene Weill, John Vontas (2015) *Transcriptome profiling and genetic study reveal amplified carboxylesterase genes implicated in temephos resistance, in the Asian Tiger Mosquito *Aedes albopictus**. *PLoS Negl Trop Dis* 9(5):e0003771, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003771>
- Ilias Kioulos, **Anastasia Kampouraki**, Evangelia Morou, George Skavdis, John Vontas (2014) *Insecticide resistance status in the major West Nile virus vector *Culex pipiens* from Greece*. *Pest Management Science* 70: 623-627 <https://doi.org/10.1002/ps.3595>

## Προφορικές ανακοινώσεις σε συνέδρια

- **A. Kampouraki**, E. Roditakis, N. Pavlidi, A. Vlachaki, M. Stavrakaki, I. Vouganis, D. Gilpathi and J. Vontas Analysis and monitoring of insecticide resistance in the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). 17th Panhellenic Entomological Congress Athens, Agricultural University of Athens, 19-22 September 2017  
[http://www.entsoc.gr/17pes/wp-content/uploads/2017/09/programme\\_lowres.pdf](http://www.entsoc.gr/17pes/wp-content/uploads/2017/09/programme_lowres.pdf)

#### Συμμετοχή σε ανακοινώσεις σε συνέδρια

- J. Vontas, N. Pavlidi, **A. Kampouraki**, M. Stavrakaki, N. Wybouw, W. Dermauw, R. Nauen, T. Van Leeuwen, E. Roditakis Pyrethroid resistance in the olive fruit fly *Bactrocera oleae* : evolution, molecular characterisation and operational impact. 14th European Congress of Entomology. 2-6 JULY 2018, NAPLES, ITALY
- L. Grigoraki, L. Swevers, **A. Kampouraki**, V. Mpalampanidou, P. Labbe, A. Chaskopoulou, M. Weill and J. Vontas Molecular characterization and geographical distribution of temephos resistance in the major dengue and chikungunya vector *Aedes albopictus*. 17th Panhellenic Entomological Congress Athens, Agricultural University of Athens, 19-22 September 2017.
- V. Balabanidou, M. Aivaliotis, J.R. Girotti, **A. Kampouraki**, G. Lycett, H. Ranson, P. Juarez and J. Vontas The Achilles' heel of *Anopheles gambiae*? (LEGOmics). 17th Panhellenic Entomological Congress Athens, Agricultural University of Athens, 19-22 September 2017.
- N. Pavlidi, **A. Kampouraki**, V. Tseliou, N. Wybou, W. Dermauw, T. Van Leeuwen, J. Vontas. Identification and molecular characterization of pyrethroid resistance in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. 16th Panhellenic Entomological Congress Heraklio, 20-23 October 2015,
- C.CH. Voudouris, P.A. Eliopoulos, P. Skouras, A.P. Kalaitzaki, **N. Kampouraki**, A.N. Kati, J. Vontas AND J.T. Margaritopoulos Monitoring of resistance of Greek Mediterranean fruit fly populations to the insecticides deltamethrin and spinosad. 16th Panhellenic Entomological Congress Heraklio, 20-23 October 2015
- L. Grigoraki, V. Balabanidou, M. Fotakis, A. Chaskopoulou, **N. Kampouraki**, A. Anthousi, G. Lycett, H. Ranson AND J. Vontas Molecular characterization of insecticide resistance in mosquito - disease vectors. 16th Panhellenic Entomological Congress Heraklio, 20-23 October 2015 (oral Grigoraki)
- Douris V., Koutsioulis D., **Kampouraki N.**, Marinis D., Mironidis G.K., Christou I.K., Bouriotis V. and Vontas J. Molecular and functional characterization of three chitin deacetylase-like genes from *Helicoverpa armigera*. 9th International Workshop on the Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera, Kolympari, Crete, Greece, 17-23 August 2014 (poster)
- N. Pavlidi, N. Wybouw, W. Dermauw, **A. Kamouraki**, Y. Livadaras, G. Skavdis, T. Van Leeuwen, J. Vontas. Genomic approaches for understanding the adaptation of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* to olives. XVI International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Rhodes 6-10 July 2014 (poster).
- Grigoraki L., Poupardin R., Pavlidi N., **Kampouraki A.**, Lirakis M., Morou E., Wondji C., and Vontas J. Molecular characterization of temephos resistance in the major dengue and chikungunya vector *Aedes albopictus*, 2013 Kolympari mosquito meeting, Kolympari Greece, 15-19 July 2013 (oral Grigoraki).