



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

Διδακτορική Διατριβή

Ανάλυση ανθεκτικότητας του ακάρεος *Varroa destructor* (Acari: Varroidae)
σε ακαρεοκτόνα και ανάπτυξη εφαρμογών αντιμετώπισης,
με χρήση βιοτεχνολογίας και βιοεντομοκτόνων



Σπυρίδων Α. Βλογιαννίτης

Επιβλέπων Καθηγητής:

Ιωάννης Βόντας, Καθηγητής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Ιωάννης Βόντας, Καθηγητής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Νικόλαος Λάμπρου, Καθηγητής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Thomas Van Leeuwen, Καθηγητής, University of Ghent, Belgium

**ΑΘΗΝΑ
2022**



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

Διδακτορική Διατριβή

Ανάλυση ανθεκτικότητας του ακάρεος *Varroa destructor* (Acari: Varroidae)
σε ακαρεοκτόνα και η ανάπτυξη εφαρμογών αντιμετώπισης,
με χρήση βιοτεχνολογίας και βιοεντομοκτόνων

«Analysis of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) resistance to acaricides and
development of novel treatments based on Biotechnology and Bio-insecticides»

Σπυρίδων Λ. Βλογιαννίτης

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Ιωάννης Βόντας, Καθηγητής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών (επιβλέπων)

Νικόλαος Λάμπρου, Καθηγητής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Thomas Van Leeuwen, Καθηγητής, University of Ghent, Belgium

Αναστασία Τσαγκαράκου, Ερευνήτρια Α', ΕΛΓΟ «ΔΗΜΗΤΡΑ»

Εμμανουήλ Ροδιτάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής, ΕΛ.ΜΕ.ΠΑ

Γεώργιος Γκόρας, Επίκουρος Καθηγητής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Κωνσταντίνος Αλιφέρης, Επίκουρος Καθηγητής, Γεωπονικό Παν/μιο Αθηνών

Ανάλυση ανθεκτικότητας του ακάρεος *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) σε ακαρεοκτόνα και η ανάπτυξη εφαρμογών αντιμετώπισης, με χρήση βιοτεχνολογίας και βιοεντομοκτόνων

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής
Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας

Περίληψη

Η μελισσοκομία αποτελεί σημαντικό παράγοντα οικονομικής και οικολογικής σταθερότητας παγκοσμίως. Η συνεισφορά της μελισσοκομίας στην οικονομία μέσω της επικονίασης των καλλιεργειών είναι μια «υπηρεσία» που κοστολογείται στα 215 δις ευρώ το χρόνο. Ωστόσο, η κατάρρευση των αποικιών των μελισσών βρίσκεται σε ανοδική πορεία και αποτελεί σημαντικότερο πρόβλημα παγκοσμίως. Η μόλυνση των αποικιών από τα ακάρεα Βαρρόα θεωρείται ότι είναι ένας από τους κυριότερους παράγοντες που οδηγεί στην κατάρρευση τους. Οι τρόποι αντιμετώπισης των Βαρρόα είναι περιορισμένοι και περιλαμβάνουν χημικές ουσίες, οι οποίες έχουν μειωμένη αποτελεσματικότητα εξαιτίας της ανάπτυξης ανθεκτικών πληθυσμών Βαρρόα. Η καταγραφή περιστατικών και η ανάλυση των μηχανισμών ανθεκτικότητας είναι σημαντική προϋπόθεση για τη διαχείρισή της. Η επιστήμη της βιοτεχνολογίας αλλά και οι εξελίξεις στην ανάπτυξη βιοεντομοκτόνων προσφέρουν δυνατότητες αντιμετώπισης του Βαρρόα με σύγχρονες μεθόδους, φιλικές προς το περιβάλλον. Στην παρούσα διατριβή, επιχειρείται η ανάλυση της ανθεκτικότητας του Βαρρόα στο σύνολο των συνθετικών ακαρεοκτόνων που χρησιμοποιούνται για τη καταπολέμηση του, με κλασικές και σύγχρονες τεχνικές (βιοδοκιμές, μοριακές μεθόδους, ανάλυση μεταγραφώματος, βιοχημικές αναλύσεις κ.ά.). Παράλληλα, πραγματοποιείται η ανάπτυξη και αξιολόγηση εφαρμογών με βάση τη βιοτεχνολογία και τη χρήση βιοεντομοκτόνων για την αντιμετώπιση δυσεξόντοτων – ανθεκτικών πληθυσμών του παρασίτου.

Επιστημονική περιοχή: Μηχανισμοί ανθεκτικότητας εντόμων

Λέξεις κλειδιά: *Varroa destructor*, ανθεκτικότητα, ακαρεοκτόνα, εντομοκτόνα, μέλισσες, βιοεντομοκτόνα

Analysis of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) resistance to acaricides and development of novel treatments based on Biotechnology and Bio-insecticides

*Department of Crop Science
Laboratory of Agricultural Pharmacology*

Abstract

Beekeeping consists a significant factor of economic and ecological stability worldwide. The contribution of beekeeping to the global economy through the pollination of crops is estimated at 215 billion euros per year. However, colony collapse disorder is increased rapidly and constitute a major problem of beekeeping worldwide. Infection of bee colonies by *Varroa* mites is considered to be one of the main factors, leading to their collapse. *Varroa* control treatments are limited and comprise chemicals, which have reduced efficacy due to the development of resistant *Varroa* populations. Monitoring for incidents and analysis of resistance mechanisms are important precondition for *Varroa* resistance management. Biotechnology and the development of biopesticides offer modern methods in *Varroa* control, enviromentally friendly. In the present dissertation, the analysis of *Varroa* resistance to all synthetic acaricides was performed, using classical and modern techniques such as bioassays, molecular methods, transcript analysis, biochemical analysis etc. Furthermore, the development and evaluation of applications based on biotechnology and the use of biopesticides for the treatment of resistant *Varroa* populations were carried out.

Scientific area: Insecticide resistance

Keywords: *Varroa destructor*, resistance, acaricides, insecticides, honey bees, biopesticides

Ο Υποψήφιος Διδάκτωρ Βλογιαννίτης Σπυρίδων του Λεωνίδα δηλώνω ότι το υλικό της Διδακτορικής μου Διατριβής με τίτλο «Ανάλυση ανθεκτικότητας του ακάρεος *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) σε ακαρεοκτόνα και ανάπτυξη εφαρμογών αντιμετώπισης, με χρήση βιοτεχνολογίας και βιοεντομοκτόνων» είναι πρωτότυπο και δεν έχω προβεί σε λογοκλοπή ή κλοπή δεδομένων ή κλοπή εικόνων, σχεδίων ή γραφημάτων ή κλοπή σχημάτων, εικόνων, σχεδίων, γραφημάτων, σκίτσων ή φωτογραφιών. Επίσης, τα μέλη της Τ.Σ.Ε. ή επταμελούς εξεταστικής επιτροπής δεν φέρουν ευθύνη για ενδεχόμενη λογοκλοπή ή κλοπή δεδομένων του Υποψήφιου Διδάκτορα που σχετίζεται με την εκπόνηση της Δ.Δ.

Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής της Σχολής Αγροτικής Παραγωγής Υποδομών & Περιβάλλοντος του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνωμών του συγγραφέως (Ν. 5343/1932, άρθρο 202, παρ.2)

Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνα -2^{ος} Κύκλος» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)



*Στην οικογένειά μου
Λεωνίδα, Ευσταθία,
Βαγγέλη και Ευαγγελία*

Περιεχόμενα

Περίληψη	i
Abstract	ii
Περιεχόμενα.....	v
Πρόλογος/Ευχαριστίες.....	ix
Συντομογραφίες.....	x
Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή	1
1.1 Η βαρροϊκή ακαρίαση	1
1.2 Το πρόβλημα της βαρροϊκής ακαρίασης στην Ελλάδα	4
1.3 Μορφολογία	5
1.4 Διάδοση – προσβολή	7
1.5 Παθογένεια μέλισσας και παρασιτισμός από <i>Varroa</i>	8
1.6 Η Αντιμετώπιση του Βαρρόα	9
1.6.1 Βιολογική καταπολέμηση	10
1.6.2 Χημική καταπολέμηση	11
1.7 Η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα/ακαρεοκτόνα	15
1.7.1 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας	17
1.8 Η ανθεκτικότητα του Βαρρόα στα ακαρεοκτόνα	19
1.9 Σκοπός της μελέτης.....	21
Κεφάλαιο 2. Διερεύνηση των επιπέδων και χαρακτηρισμός του μηχανισμού της ανθεκτικότητας του βαρρόα στο <i>Coumaphos</i>	22
2.1 Περίληψη	22
2.2 Εισαγωγή.....	23
2.3 Υλικά και Μέθοδοι	24
2.3.1 Χημικές ουσίες και ¹⁴ C- <i>coumaphos</i>	24
2.3.2 Βιολογικό υλικό (πληθυσμοί <i>Varroa</i>)	24
2.3.3 Βιοδοκιμές.....	25
2.3.4 Προσδιορισμός ενεργότητας ενζύμων αποτοξικοποίησης και παρεμπόδισης της Ακετυλοχολινεστεράσης.....	25
2.3.5 Ανάλυση μεταβολισμού της δ.ο <i>Coumaphos</i>	30
2.3.6 Αλληλούχιση RNA (RNA sequencing).....	32

2.3.7 Εντοπισμός γονιδίων P450s στο γονιδίωμα (gene annotation).....	35
2.3.8 Μέθοδος λειτουργικής επικύρωσης της παρεμβολής RNA (RNAi – RNA interference)	36
2.3.9 Αντίδραση ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο (Real Time qPCR) για την σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων <i>CYP4EP4</i> και <i>CYP3012A6</i> σε ανθεκτικούς και ευαίσθητους πληθυσμούς <i>Varroa</i>	37
2.4 Αποτελέσματα.....	41
2.4.1 Χαρακτηρισμός της ανθεκτικότητας στη δ.ο Coumaphos, πληθυσμού Βαρρόα από το νησί της Άνδρου	41
2.4.2 Η ανθεκτικότητα δεν οφείλεται σε μειωμένη είσοδο του Coumaphos στα ανθεκτικά Βαρρόα	43
2.4.3 Η ανθεκτικότητα δεν σχετίζεται με αυξημένη αποτοξικοποίηση στα ανθεκτικά Βαρρόα	44
2.4.4 Η μειωμένη ενεργοποίηση του Coumaphos σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στα ανθεκτικά Βαρρόα.....	47
2.4.5 Κυτοχρωμικές P450s του <i>Varroa destructor</i>	48
2.4.6 Οι κυτοχρωμικές P450 μονοοξυγενάσες <i>CYP4EP4</i> , <i>CYP3012A6</i> σχετίζονται με την μειωμένη ενεργοποίηση του Coumaphos στα ανθεκτικά Βαρρόα.	49
2.4.7 Η σίγηση της <i>CYP4EP4</i> του <i>Varroa destructor</i> αποτρέπει την ενεργοποίηση του Coumaphos και αυξάνει την αντοχή στα ευαίσθητα <i>Varroa</i>	52
2. 5 Συζήτηση	55
Κεφάλαιο 3. Ανίχνευση και παρακολούθηση ανθεκτικότητας στόχου σε πυρεθροειδή πληθυσμών Βαρρόα από περιοχές της Ελλάδας και του Βελγίου, με μοριακά διαγνωστικά.....	59
3.1 Περίληψη	59
3.2 Εισαγωγή.....	60
3.3 Υλικά και Μέθοδοι	60
3.3.1 Χημικές ουσίες.....	60
3.3.2 Βιολογικό υλικό.....	61
3.3.3 Συλλογή βιολογικού υλικού	63
3.3.4 Βιοδοκιμές.....	64
3.3.5 Απομόνωση DNA, ενίσχυση και αλληλούχιση τμήματος VGSC.	64
3.4 Αποτελέσματα.....	69

3.4.1 Παρακολούθηση της παρουσίας και συχνότητας εμφάνισης γνωστών μεταλλαγών ανθεκτικότητας σε πληθυσμούς Βαρρόα από την Ελλάδα.....	69
3.4.2 Παρακολούθηση της παρουσίας και συχνότητας εμφάνισης γνωστών μεταλλαγών ανθεκτικότητας σε πληθυσμούς Βαρρόα από το Βέλγιο	72
3.4.3 Απόκριση πληθυσμών Βαρρόα, με και χωρίς τη μεταλλαγή L925V, στο Flumethrin.....	76
3.5 Συζήτηση	77
Κεφάλαιο 4. Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας του Amitraz σε πληθυσμούς Βαρρόα από διάφορες περιοχές της Ελλάδας καθώς και σε ανθεκτικούς πληθυσμούς σε άλλα ακαρεοκτόνα.	84
4.1 Περίληψη	84
4.2 Εισαγωγή.....	84
4.3 Υλικά και Μέθοδοι	85
4.3.1 Βιολογικό υλικό.....	85
4.3.2 Πληθυσμοί <i>Varroa</i> από περιοχές της Ελλάδας	85
4.3.3 Συλλογή βιολογικού υλικού και βιοδοκιμές.....	87
4.3.4 Απομόνωση DNA, ενίσχυση και αλληλούχιση του β-αδρενεργικού υποδοχέα.	87
4.4 Αποτελέσματα.....	92
4.4.1 Ευαισθησία πληθυσμών <i>V. Destructor</i> , από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, στο Amitraz	92
4.4.2 Παρακολούθηση της παρουσίας μεταλλαγών ανθεκτικότητας σε πληθυσμούς Βαρρόα από την Ελλάδα	94
4.5 Συζήτηση	95
Κεφάλαιο 5. Αξιολόγηση βιοεντομοκτόνων φυσικής προέλευσης ως προς την δράση τους έναντι του <i>Varroa destructor</i>	98
5.1 Περίληψη	98
5.2 Εισαγωγή.....	98
5.3 Υλικά και Μέθοδοι	100
5.3.1 Χημικές ουσίες	100
5.3.2 Συλλογή πληθυσμών <i>Varroa</i> , μελισσών και βιοδοκιμές.....	101
5.4 Αποτελέσματα.....	106

5.4.1 Αξιολόγηση αποτελεσματικότητας βιοεντομοκτόνων φυσικής προέλευσης για την αντιμετώπιση δυσεξόντοτων – ανθεκτικών πληθυσμών Βαρρόα.....	106
5.4.2 Αξιολόγηση της συνεργιστικής δράσης βιοεντομοκτόνων φυσικής προέλευσης με το συνθετικό πυρεθροειδές ακαρεοκτόνα <i>Flumethrin</i>	107
5.4.3 Έλεγχος οξείας τοξικότητας βιοεντομοκτόνων μέσω επαφής σε μέλισσες (<i>Apis mellifera</i>)	108
5.5 Συζήτηση	109
Κεφάλαιο 6. Συζήτηση – Προοπτικές.....	111
Βιβλιογραφία	116
Δημοσιεύσεις/Ανακοινώσεις της Διδακτορικής Διατριβής (ΔΔ)	124
Επιστημονικές δημοσιεύσεις σε περιοδικά με κριτές.....	124
Ανακοινώσεις	124
Λοιπές Δημοσιεύσεις/Ανακοινώσεις	125
Επιστημονικές δημοσιεύσεις σε περιοδικά με κριτές.....	125
Ανακοινώσεις	125
Υπεύθυνη Δήλωση Υποψήφιου Διδάκτορος	126
Δήλωση έργου Υποψήφιου Διδάκτορος.....	127

Πρόλογος/Ευχαριστίες

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, με επιβλέποντα τον Καθηγητή κ. Ι. Βόντα στον οποίο οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ για τη καθοδήγηση, την επιμόρφωση, τη στήριξη με κάθε τρόπο και το ευχάριστο κλίμα που επικράτησε κατά τη συνεργασία μας.

Ένα μεγάλο μέρος των εργασιών της διατριβής πραγματοποιήθηκε στο University of Ghent υπό τη συνεπίβλεψη του Καθηγητή κ. Thomas Van Leeuwen, ο οποίος με δέχθηκε στο εργαστήριο του και συνεργαστήκαμε στο σύνολο των πειραμάτων, εξασφαλίζοντας μου στήριξη καθ'όλη τη διάρκεια της παραμονής μου και άριστες συνθήκες εργασίας.

Επίσης, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στο τρίτο μέλος της Συμβουλευτικής μου επιτροπής, καθηγητή Ενζυμικής Τεχνολογίας κ. Ν. Λάμπρου για την άριστη συνεργασία και το ιδιαίτερα φιλικό κλίμα που επικρατούσε στις συναντήσεις μας καθώς επίσης και λοιπά μέλη της εξεταστικής επιτροπής κα. Α.Τσαγκαράκου, κ. Ε.Ροδιτάκη, κ.Γ.Γκόρα και κ.Κ.Αλιφέρη για την συμβολή τους και αξιολόγηση της παρούσας διατριβής.

Σημαντικός αρωγός για την πραγματοποίηση των πειραματικών στόχων αποτελούν οι συνεργάτες μας. Όμως, απαραίτητη προϋπόθεση για την επιτυχία αυτών είναι η συνέργια με επιτυχημένους μεταδιδακτορικούς ερευνητές Ευαγγελία Μώρου (ΓΠΑ,IMBB-ITE) και Κωνσταντίνο Μαυρίδη (IMBB-ITE). Τους ευχαριστώ απεριόριστα για την επιμόρφωση και τη βοήθεια σε όλες τις δύσκολες στιγμές.

Φυσικά, οι απεριόριστες ώρες που αφιερώνεις στον εργαστηριακό χώρο γίνονται πιο ευχάριστες όταν έχεις δίπλα σου αξιόλογους ανθρώπους όπως οι (μετά)διδακτορικοί ερευνητές και φίλοι, Εύα Κάτσαβου, Μαξ Φωτάκης, Σοφία Μπαλάσκα, Μάιρα Λυκογιάννη και Ειρήνη Ξαξίρη. Το φιλικό κλίμα και ο αλληλοσεβασμός που αναπτύχθηκε μεταξύ μας, εύχομαι να μην αλλοιωθεί ποτέ.

Δεδομένης της φύσης της διδακτορικής μου διατριβής που αποτελεί μια σύμπραξη των εργαστηρίων Γεωργικής Φαρμακολογίας και Μελισσοκομίας-Σηροτροφίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργ. Μελισσοκομίας για τη βοήθεια τους σε όλα τα επίπεδα της έρευνας. Η παροχή γνώσεων, σπάνιου βιολογικού υλικού, εξοπλισμού αλλά κυρίως η ομόνοια που επικρατούσε με τους Δημήτρη Λαζαράκη,Θανάση Αντωνόπουλο, Δημήτρη Μαυρονάσιο, Ιωάννη Ρέρρα και Βαγγέλη Παπά αποτέλεσε θεμελιώδη παράγοντα για την επιτυχία των πειραμάτων.

Τέλος, ο πιο σημαντικός παράγοντας επιτυχίας στη ζωή κάθε ανθρώπου αποτελεί η οικογένεια. Χωρίς την στήριξη της οποίας πολύ λίγα πράγματα είναι εφικτά. Ευχαριστώ τους δικούς μου ανθρώπους και τους αφιερώνω τη παρούσα μελέτη.

Συντομογραφίες

Γ.Π.Α	Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
δ.ο	δραστική ουσία
ΕΕ	Ευρωπαϊκή Ένωση
ΗΠΑ	Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής
Φ.Π.	Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα
ΟΡ	Οργανοφωσφορικά
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
RR	Resistance Ratio (Συντελεστής Ανθεκτικότητας)
IRM	Insecticide Resistance Management
IRAC	Insecticide Resistance Action Committee
VGSC	Volgate gated sodium channel
DEGs	Differentially Expressed Genes
FC	Fold Change
CI	Confidential Interval (Διάστημα αξιοπιστίας)
SE	Standard Error (Τυπικό σφάλμα)
mRNA	messenger RNA (Αγγελιαφόρο RNA)
bp	base pair (ζεύγος βάσεων)
cDNA	complementary DNA (συμπληρωματικό DNA)
DNA	Deoxyribonucleic acid
kdr	knockdown resistance
P-value	Probability-value (Τιμή σημαντικότητας)
PCR	Polymerase chain reaction (Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης)
R	Resistant allele (ανθεκτικό αλληλόμορφο)
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
EPPO	European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO)

Διεθνές σύστημα μονάδων

μg	microgram
μL	microliters
μM	micromolar
cm	centimetre (εκατοστό)
M	Molar
pH	Ενεργός οξύτητα (Potential of Hidrogen scale)
CI	Διάστημα αξιοπιστίας (Confidence Interval)

Αμινοξέα, ένα και τρία γράμματα (κωδικοποίηση)

Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Aspartic Acid	Asp	D
Cysteine	Cys	C
Glutaminic acid	Glu	E
Glutamine	Gln	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Iso	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Methionine	Met	M
Phenylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Thyptophan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή

1.1 Η βαρροϊκή ακαρίαση

Η μελισσοκομία παίζει πολύ σημαντικό ρόλο σε διατροφικό, οικονομικό και οικολογικό επίπεδο παγκοσμίως. Η άμεση συνεισφορά της μελισσοκομίας στην οικονομία περιλαμβάνει την παραγωγή προϊόντων της μέλισσας (μέλι, κερι, γύρη πρόπολη, βασιλικός πολτός) ενώ ακόμα πιο σημαντική είναι η έμμεση συνεισφορά της μέσω της επικονίασης (Εικόνα 1.1). Υπολογίζεται ότι το ποσοστό της επικονίασης καλλιεργειών που πραγματοποιείται από τις μέλισσες, ξεπερνά το 80% (εκτιμώμενη αξία > 215 δισ. ευρώ/έτος) (Hung et al. 2018). Στην Ελλάδα υπάρχουν περισσότερες από 1.454.000 κυψέλες που αντιπροσωπεύουν το 8% του συνολικού αριθμού κυψελών που υπάρχουν στην Ε.Ε (European Commission 2020). Τα τελευταία όμως χρόνια παρατηρείται μεγάλη μείωση των πληθυσμών των μελισσών σε παγκόσμιο επίπεδο, με το φαινόμενο να έχει ονομαστεί ως Σύνδρομο κατάρρευσης μελισσιών (CCD) (vanEngelsdorp et al. 2009) κατά το οποίο παρατηρείται ταχεία απώλεια του πληθυσμού της κυψέλης. Υπάρχουν αρκετές θεωρίες ως προς τους λόγους που συμβάλλουν στο σύνδρομο CCD, όπως η εκτεταμένη γεωργία και η χρήση φυτοφαρμάκων. Η επίδραση των φυτοφαρμάκων στις μέλισσες γίνεται τόσο άμεσα, κατά τους ψεκασμούς, όσο και έμμεσα, μέσω των υπολειμμάτων των φυτοφαρμάκων που μεταφέρονται εντός της κυψέλης μέσω της γύρης του νέκταρος και του νερού. Επιπλέον λόγοι που έχουν ενοχοποιηθεί είναι η κλιματική αλλαγή και η φτωχή διατροφή των μελισσών.

Όμως, ο κυριότερος λόγος εκδήλωσης του συνδρόμου CCD, φαίνεται να είναι ο παρασιτισμός από το άκαρι Βαρρόα (*Varroa destructor*) και οι σοβαρές ασθένειες που μεταφέρονται στις μέλισσες μέσω αυτού. Τα σημαντικά αυτά προβλήματα έχουν άμεσο αντίκτυπο στον κλάδο της μελισσοκομίας σε εθνικό επίπεδο, με τη χώρα μας να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη μείωση (62.3 %) του αριθμού των μελισσοκόμων μεταξύ των χωρών της Ε.Ε για τα έτη 2020-2022 σε σύγκριση με τα έτη 2017-2019 (European Commission 2020).

Το άκαρι Βαρρόα (*Varroa destructor*) αποτελεί τον κυριότερο εχθρό των μελισσών και παρασιτεί σε όλα τα στάδια των μελισσών (γόνος και ενήλικες μέλισσες) (Εικόνες 1.2,1.3). Τα προβλήματα που δημιουργεί είναι τόσο άμεσα, αφού τρέφεται με το λιπόσωμα και την αιμολέμφο των μελισσών, με αποτέλεσμα να δημιουργεί ασθενικές μέλισσες με μικρή

διάρκεια ζωής, όσο και έμμεσα μέσω της μετάδοσης ιώσεων (Ramsey et al. 2019). Τα αποτελέσματα του παρασιτισμού είναι καταστροφικά αφού έχει συσχετιστεί άμεσα και με το σύνδρομο CCD παγκοσμίως (vanEngelsdorp et al. 2009).



Εικόνα 1.1. Επικονίαση άνθους *Citrus reticulata* από ενήλικη εργάτρια μέλισσα (*Apis mellifera*)



Εικόνα 1.2. Ενήλικη εργάτρια μέλισσα παρασιτισμένη από το άκαρι *Varroa destructor*



Εικόνα 1.3. Μέλισσα σε νυμφικό στάδιο παρασιτισμένη από το άκαρι *Varroa destructor*

1.2 Το πρόβλημα της βαρροϊκής ακαρίασης στην Ελλάδα

Το εκτοπαράσιτο της μέλισσας *Varroa*, υπολογίζεται ότι ήρθε στη χώρα μας το 1978 και συνοδεύτηκε από σημαντικές μειώσεις των πληθυσμών μελισσών και παραγωγής μελιού (Potts et al. 2010). Αρχικά, το *Varroa* εντοπίστηκε στη Θράκη κοντά στα σύνορα με τη Βουλγαρία και στη συνέχεια εξαπλώθηκε στη Μακεδονία, στη Θεσσαλία και στην περιοχή της Πελοποννήσου (Griffiths & Bowman 1981)

Τα προβλήματα που δημιούργησε στην Ελλάδα πήραν τη μεγαλύτερη έκταση τους το 1981, οπότε είχαμε και τις μεγαλύτερες απώλειες σε μελισσοσμήνη και παραγωγή μελιού ενώ από τη πρώτη στιγμή άρχισε η χημική καταπολέμηση του ακάρεος με πληθώρα σκευασμάτων τα περισσότερα εκ των οποίων απαγορεύτηκαν με τη πάροδο των χρόνων.

Το Μαλάθειο 5% και το Asuntol 50% (δραστική ουσία Coumaphos) αποτέλεσαν τα κυριότερα φάρμακα που εφαρμόστηκαν από τους Έλληνες μελισσοκόμους την πρώτη δεκαετία εισόδου της βαρρόα στην Ελλάδα. Από το 1988 και μετά καθιερώθηκε η χρήση του σκευάσματος Manvic (δραστική ουσία Tau-fluvalinate), αν και δεν ήταν εγκεκριμένο για χρήση στην μελισσοκομία (Θρασυβούλου 2005). Ωστόσο η σχεδόν αποκλειστική χρήση του σκευάσματος αυτού είχε ως αποτέλεσμα τη ανάπτυξη ανθεκτικότητας της βαρρόα στη δραστική ουσία Tau-fluvalinate τόσο στην Ελλάδα όσο και άλλες ευρωπαϊκές χώρες (Θρασύβουλου et al. 1998).

Στα τέλη της δεκαετίας του '90 ξεκίνησε η χρήση εναλλακτικών μεθόδων αντιμετώπισης του βαρρόα, όπως αιθέρια έλαια, θυμόλη, μενθόλη, φορμικό οξύ, γαλακτικό οξύ και οξαλικό οξύ. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν και μηχανικοί τρόποι απομάκρυνσης του Βαρρόα από τη κυψέλη είτε με χρήση κηφνοκηρήθρας για την προσέλκυση και εγκλωβισμό των Βαρρόα εντός του κηφνόγονου (Santas & Lazarakis 1984) είτε με χρήση ζάχαρης άχνης ως ανόργανο υλικό που παρεμβάλλεται μεταξύ των ακάρεων και του σώματος της μέλισσας, με αποτέλεσμα το άκαρι να μη μπορεί να συγκρατηθεί άνω της μέλισσας και να απομακρύνεται λόγω βαρύτητας (Berry et al. 2012).

Η τωρινή κατάσταση αντιμετώπισης του ακάρεος χαρακτηρίζεται ως κρίσιμη αλλά σταθερή. Η πλειονότητα των μελισσοκόμων κάνουν χρήση τόσο ακαρεοκτόνων όσο και εναλλακτικών τρόπων αντιμετώπισης του βαρρόα. Οι δραστικές ουσίες που έχουν πάρει έγκριση στην Ελλάδα και χρησιμοποιούνται είναι το οργανοφωσφορικό Coumaphos, το φορμαμιδικό Amitraz και τα πυρεθρινοειδή Tau-fluvalinate και Flumethrin. Παράλληλα

εκτεταμένη είναι η χρήση των οργανικών οξέων με κυριότερο το οξαλικό οξύ, το οποίο είναι και αποδεκτό για χρήση και στη βιολογική μελισσοκομία.

1.3 Μορφολογία

Το βαρρόα παρουσιάζει σημαντικές διαφορές μεταξύ των δυο φύλων. Μόνο το θηλυκό βαρρόα παρουσιάζει παρασιτική δράση στον γόνο (εικόνα 1.3) και στις ενήλικες μέλισσες (εικόνα 1.2). Το ενήλικο θηλυκό έχει καστανοκόκκινο χρώμα, ελλειπτικού σχήματος (εικόνα 1.4) με μέσο μήκος 1.1 mm και μέσο πλάτος 1.5 mm. Έχει τέσσερα ζεύγη ποδιών τα οποία του επιτρέπουν την γρήγορη κίνηση εντός της κυψέλης. Το αρσενικό βαρρόα έχει αποκλειστικά αναπαραγωγικό ρόλο και χαρακτηρίζεται από σφαιρικό σχήμα και υπόλευκο χρωματισμό. Είναι μικρότερο από το θηλυκό καθώς έχει διάμετρο μόλις 0.8 mm, ενώ έχει μαλακό σώμα, παρόμοιο με τα ανώριμα στάδια ενός θηλυκού βαρρόα (FAO 2015). Τα αρσενικά ακάρεα έχουν σύντομο χρόνο ζωής, δεν μπορούν να επιβιώσουν εκτός του σφραγισμένου γόνου και πεθαίνουν λόγω έλλειψης τροφής καθώς τα στοματικά μέρη τους έχουν μεταπλασθεί σε όργανα για τη μεταφορά σπέρματος στα γεννητικά μέρη των θηλυκών βαρρόα (FAO 2015).

Ο βιολογικός κύκλος του ακάρεος χωρίζεται σε δύο φάσεις, τη φάση της διασποράς κατά την οποία τρέφονται με λιπόσωμα και αιμολέμφο (phoretic phase) και τη φάση αναπαραγωγής (reproductive phase) εντός κελιών με γόνο μελισσών (Ramsey et al. 2018) (Ρίου et al. 2012). Η προσβολή στον γόνο αρχίζει με την είσοδο ενός ενήλικου θηλυκού γονιμοποιημένου βαρρόα σε ένα κελί που περιέχει προνούμφη. Τα βαρρόα δείχνουν μεγαλύτερη προτίμηση στον κηφηνόγονο, παρά στον εργατικό γόνο κυρίως λόγω του μεγαλύτερου σε διάρκεια βιολογικού κύκλου που έχουν οι κηφήνες έναντι των εργατριών. Συνήθως δεν προσβάλλουν τα βασιλικά κελιά. Έχουν όμως αναφερθεί περιπτώσεις προσβολής σε έντονα μολυσμένα μελίσσια (Harizanis 1991).

Μετά την είσοδό του στο κελί, το θηλυκό άκαρι διεισδύει στο τοίχωμα του κελιού και φθάνει στον πυθμένα όπου βρίσκεται η τροφή της προνούμφης. Όταν το κελί σφραγίζεται, ενώ η προνούμφη έχει ήδη καταναλώσει την τροφή της, το άκαρι αρχίζει να τρέφεται με την αιμολέμφο της αναπτυσσόμενης προνούμφης (Χαριζάνης 2014). Το θηλυκό βαρρόα εναποθέτει δύο με έξι αυγά κάθε 30 ώρες πάνω στη προνούμφη της μέλισσας ή πάνω στα τοιχώματα του κελιού. Από το πρώτο (απλοειδή) αυγό θα γεννηθεί το μόνο αρσενικό και από τα ακόλουθα

(διπλοειδή) αυγά θα γεννηθούν μόνο θηλυκά. Μέσα στο αυγό θα αναπτυχθεί μια εξάποδη προνύμφη, ύστερα μεταμορφώνεται σε οκτάποδη πρωτονύμφη και εξέρχεται από αυτό. Η πρωτονύμφη μεταμορφώνεται σε δευτερονύμφη και αυτή σε ενήλικο. Ολόκληρος ο βιολογικός κύκλος διαρκεί 6 ημέρες περίπου για τα θηλυκά άτομα και 7 για τα αρσενικά. Το νεογέννητο βαρρόα παρασιτεί απευθείας την νύμφη μέλισσας ενώ η αναπαραγωγική περίοδος των βαρρόα σχετίζεται με τη διάρκεια μεταμόρφωσης των προνυμφών στα κελιά, η οποία είναι 12 μέρες για τις εργάτριες και 15 ημέρες για τους κηφήνες. Εάν το αρσενικό βαρρόα πεθάνει πριν γονιμοποιήσει τις αδερφές του, τότε τα θηλυκά παραμένουν στείρα και ανίκανα να αναπαραχθούν (FAO 2015).

Μόλις συμπληρωθεί η ανάπτυξη των εργατριών ή κηφηνών (21 ή 24 ημέρες αντίστοιχα), τότε η ενήλικη μέλισσα εξέρχεται από το κελί και μαζί με τη μέλισσα εξέρχονται και τα ενήλικα θηλυκά βαρρόα. Μετά την έξοδο τους από το κελί, τα θηλυκά βαρρόα εγκαταλείπουν τη νεαρή μέλισσα και προσκολλούνται σε κάποια άλλη. Εγκαθίστανται βαθιά ανάμεσα στους κοιλιακούς στερνίτες των μελισσών, επειδή μόνο τις λεπτές μεμβράνες που τα ενώνουν είναι ικανά να διατρυπήσουν με τα στοματικά τους μόρια. Η θέση αυτή εκτός από τη διατροφή τους εξασφαλίζει και ασφαλή μεταφορά. Παραμένουν πάνω στο σώμα των μελισσών από 5 έως 15 ημέρες και στη συνέχεια εισέρχονται σε κάποιο κελί για να ωοτοκήσουν (Λιάκος 1993). Η διάρκεια ζωής ενός ακάρεως είναι δύο έως τρεις μήνες το καλοκαίρι και σε εύκρατα κλίματα όπου ο βαρύς χειμώνας περιορίζει την εκτροφή του γόνου, τα θηλυκά βαρρόα παραμένουν στο σώμα των ενήλικων μελισσών για 5 έως 8 μήνες (Χαριζάνης 2014).



Εικόνα 1.4. Ενήλικο θηλυκό άκαρι *Varroa destructor* σε στερεοσκοπική απεικόνιση

1.4 Διάδοση – προσβολή

Τα προσβεβλημένα από το άκαρι μελίσσια αποτελούν και τη πηγή μόλυνσης σε μια περιοχή ενώ και η δυναμική των πληθυσμών Βαρρόα επηρεάζεται από την μετάδοση αυτών (Rosenkranz et al. 2010). Η μετάδοση μπορεί να γίνει τόσο έμμεσα όπως μέσω λουλουδιών και μελισσοκομικών χειρισμών, όσο και άμεσα με πτήσεις μελισσών μεταξύ της δικιάς τους κυψέλης και μιας προσβεβλημένης. Η άμεση μετάδοση μπορεί να γίνει μέσω της λεηλασίας και της παραπλάνησης από κηφήνες ή εργάτριες μέλισσες.

Κατά τη παραπλάνηση έχουμε μονοκατευθυντική μετάδοση καθώς παραπλανημένες μέλισσες εισέρχονται σε διαφορετική κυψέλη από αυτή της οποίας ανήκουν με αποτέλεσμα τη μεταφορά βαρρόα εντός αυτής. Κατά τη διαδικασία της λεηλασίας έχουμε αμφίδρομη μετάδοση των ακάρεων, καθότι οι εργάτριες μέλισσες εισβάλλουν σε μια άλλη κυψέλη προκειμένου να κλέψουν αποθηκευμένο μέλι και ύστερα επιστρέφουν στην αρχική τους (Peck & Seeley 2019).

Επιπλέον η απόκτηση νέων μελισσοσμηνών και η μεταφορά των κυψελών σε διάφορες περιοχές για συλλογή μελιού από τους μελισσοκόμους ενδεχομένως να εισαγάγει νέους πληθυσμούς βαρρόα στο μελισσοκομείο (Rosenkranz et al. 2010).

1.5 Παθογένεια μέλισσας και παρασιτισμός από *Varroa*

Είναι γνωστό ότι οι μέλισσες διαθέτουν ισχυρούς αμυντικούς μηχανισμούς εναντίον των μικροβιακών και παρασιτικών οργανισμών. Ο κίνδυνος ανάπτυξης ασθένειας εντός της κυψέλης μειώνεται τόσο από την κοινωνική ανοσία του μελισσιού όσο και από την ατομική ανοσία της μέλισσας (DeGrandi-Hoffman & Chen 2015).

Οι αμυντικοί μηχανισμοί που έχει αναπτύξει μια αποικία μελισσών για να προστατευθεί έναντι παρασίτων και παθογόνων, πηγάζει από τη συμπεριφορική συνεργασία μεταξύ των μελισσών και ονομάζεται κοινωνική ανοσία (Cremer et al. 2007). Με τη κοινωνική ανοσία, η συντονισμένη δράση των μελισσών περιορίζει σημαντικά τη διάδοση παρασίτων και παθογόνων εντός της κυψέλης με θετικό αντίκτυπο στην υγιεινή αυτής. Η ευαίσθητη υγιεινή έναντι του Βαρρόα (*Varroa sensitive hygiene-VSH*) είναι ένα συμπεριφορικό γνώρισμα των μελισσών κατά το οποίο οι εργάτριες μέλισσες έχουν την ικανότητα να ανιχνεύουν τις νύμφες που έχουν παρασιτιστεί από το άκαρι και να τις απομακρύνουν από την κυψέλη. Αυτοί οι αμυντικοί μηχανισμοί, σε συνδυασμό με τη σύντομη διάρκεια ζωής των μελισσών και την ταχεία αντικατάσταση με υγιή άτομα, μπορούν να περιορίσουν την εξάπλωση μολύνσεων μεταξύ των μελισσών μέσα σε μια αποικία (Boecking & Sprinak 1999).

Σε ατομικό επίπεδο, οι μέλισσες διαθέτουν αρκετούς αμυντικούς μηχανισμούς έναντι παθογόνων. Φυσικοί και χημικοί φραγμοί, συμπεριλαμβανομένου του εξωσκελετού και των επιθηλιακών κυττάρων που περιβάλλουν τις μέλισσες, αποτελούν τη πρώτη μηχανική γραμμή άμυνας (DeGrandi-Hoffman & Chen 2015). Επιπλέον, μηχανισμοί όπως η εντερική μικροχλωρίδα που προστατεύει από τις μολυσματικές ασθένειες, οι κυτταρικοί αμυντικοί μηχανισμοί (αιμοκύτταρα) και οι χημικοί μηχανισμοί (ενζυμικοί και αντιμικροβιοτικοί παράγοντες) μπορούν να συμβάλουν στην αντοχή σε λοιμώξεις (Evans et al. 2006; Evans & Sprinak 2010).

Ο παρασιτισμός από το Βαρρόα προκαλεί σταδιακή εξασθένηση των παραπάνω αμυντικών μηχανισμών. Το άκαρι μυζεί την αιμολέμφο και το λιπόσωμα στα διάφορα στάδια του γόνου, με αποτέλεσμα τη μείωση του σωματικού βάρους και του προσδόκιμου όριου ζωής των εκκολαπτόμενων μελισσών (Aronstein et al. 2012; Ramsey et al. 2019). Επιπλέον, οι παρασιτισμένες μέλισσες παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα πτήσης και μικρότερη ανάπτυξη των υποφαρυγγικών αδένων (Aronstein et al. 2012), ενώ η διάτρηση του εξωτερικού

προστατευτικού στρώματος των μελισσών από το άκαρι, έχει ως αποτέλεσμα τη δυνατότητα εισόδου παθογόνων μικροοργανισμών εντός της μέλισσας.

Έχει αποδειχθεί ότι η βαρρόα έχει την ικανότητα να μεταφέρει και να μεταδώσει στις μέλισσες μια σειρά από παθογόνους ιούς (Ramsey et al. 2019) όπως ο ιός των παραμορφωμένων φτερών (DWV), ο ιός της οξείας παράλυσης (IAPV), ο ιός της βραδείας παράλυσης (SPV), ο ιός των Μελανών Βασιλικών Κελιών (BQCV), ο ιός των αδιάφανων φτερών (CWV) και ο ιός των μελισσών του Κασμίρ (KBV) και πιθανό και άλλους (DeGrandi-Hoffman & Chen 2015; Χαριζάνης 2014). Παρότι, υπάρχει σχεδόν πάντα παρουσία ιών εντός της κυψέλης, οι ιοί εμφανίζονται ως ασυμπτωματικές μολύνσεις. Σε περιόδους όμως που οι αποικίες βρίσκονται σε κατάσταση στρες παρατηρείται αύξηση του ιικού φορτίου με αποτέλεσμα τη πιθανή παρουσία συμπτωμάτων στις μέλισσες. Αυτή η συνθήκη συντηρείται από τον αυξημένο παρασιτισμό του σμήνους από Βαρρόα. Το άκαρι Βαρρόα εκτός της ικανότητας μεταφοράς ιών, δύναται να προκαλέσει καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος της μέλισσας με αποτέλεσμα την γρήγορη αύξηση και διάδοση των ιών (DeGrandi-Hoffman & Chen 2015). Ο συνδυασμός πολλαπλών παρασιτισμένων κελιών και υψηλά επίπεδαλώσεων κατά τη περίοδο του φθινοπώρου, έχει συνδεθεί με μεγάλες απώλειες μελισσοσμηνών κατά τη περίοδο του χειμώνα (Francis et al. 2013).

Σε περίπτωση που ο πληθυσμός του βαρρόα, σε σχέση με αυτόν του ξενιστή, ξεπεράσει ένα όριο, οι επιπτώσεις από τον παρασιτισμό γίνονται ορατές στον μελισσοκόμο. Οι μηχανισμοί άμυνας του μελισσιού παραλύουν, η ικανότητα ανανέωσης του πληθυσμού σταδιακά εκμηδενίζεται και τελικά το μελίσι υποκύπτει (Francis et al. 2013).

1.6 Η Αντιμετώπιση του Βαρρόα

Η αντιμετώπιση της βαρροϊκής ακαρίασης είναι αρκετά δύσκολη. Ο αριθμός των ακάρεων σε μια αποικία παρουσιάζει εποχιακή διακύμανση, με τον μέγιστο αριθμό των παρασίτων να παρουσιάζεται σε περιόδους, που υπάρχει σφραγισμένος γόνος εντός της κυψέλης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα ακάρεα να είναι προστατευμένα μέσα στα κελιά του γόνου και να μην μπορούν να καταπολεμηθούν αποτελεσματικά με οποιαδήποτε θεραπεία. Η καλύτερη περίοδος, για την αντιμετώπιση του παρασίτου, είναι στα τέλη του φθινοπώρου και του χειμώνα που υπάρχει πολύ λίγος ή καθόλου γόνος. Ο πληθυσμός του ακάρεως βρίσκεται

στα χαμηλότερα επίπεδα του και το άκαρι είναι εκτεθημένο στις θεραπευτικές επεμβάσεις που κάνει ο μελισσοκόμος (Χαριζάνης 2014).

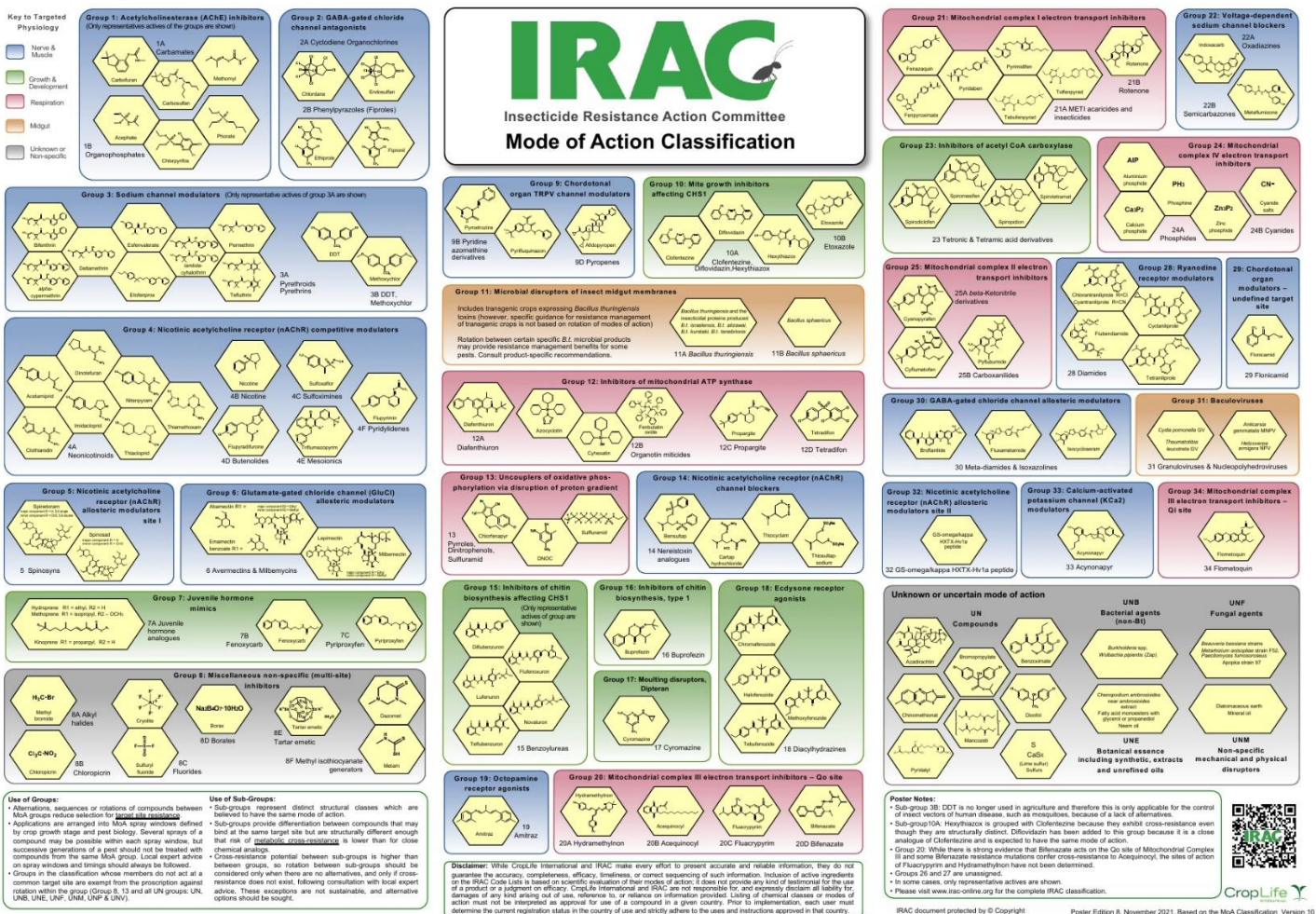
Η ολική εξάλειψη του βαρρόα δεν είναι εφικτή καθώς υπάρχουν συνεχείς επιμολύνσεις εξαιτίας των συμπεριφορικών γνωρισμάτων των μελισσών όπως η παραπλάνηση και η λεηλασία. Ωστόσο, οι μελισσοκόμοι μπορούν να διατηρήσουν παραγωγικά τα μελίσσια τους με τη διατήρηση των πληθυσμών του παρασίτου σε χαμηλά επίπεδα. Η συνεχής παρακολούθηση της προσβολής στις αποικίες, χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες μεθόδους ελέγχου, μπορούν να συμβάλλουν σημαντικά στην έγκαιρη επέμβαση και διατήρηση των πληθυσμών του βαρρόα σε χαμηλά επίπεδα. Οι μέθοδοι καταπολέμησης του ακάρεως διακρίνονται στις χημικές και στις μη χημικές μεθόδους αντιμετώπισης.

1.6.1 Βιολογική καταπολέμηση

Επιπλέον, αρκετά σημαντικό μερίδιο στην αγορά θεραπειών για τον έλεγχο του Βαρρόα καταλαμβάνουν ήπια ακαρεοκτόνα, κατά βάση φυσικής προέλευσης, όπως η θυμόλη, το οξαλικό οξύ και το μυρμηκικό οξύ. Τα ακαρεοκτόνα αυτά χαρακτηρίζονται από σχετικά ικανοποιητική αποτελεσματικότητα, μικρή υπολειμματική δράση στα προϊόντα της μέλισσας και είναι αποδεκτά για χρήση στη βιολογική μελισσοκομία. Ωστόσο, το μειονέκτημα της χρήσης τους είναι το μικρό «παράθυρο» εκλεκτικής τοξικότητας τους. Η ποσότητα δραστικής ουσίας που απαιτείται δηλαδή για να είναι αποτελεσματικά έναντι του Βαρρόα, δεν απέχει πολύ από τη ποσότητα φαρμάκου που προκαλεί σοβαρές παρενέργειες και τοξικότητα στις μέλισσες (FAO 2020). Επομένως, η χρήση των παραπάνω ακαρεοκτόνων πρέπει να είναι πολύ προσεκτική, ούτως ώστε να συνοδεύεται από το επιθυμητό αποτέλεσμα. Ακόμα και μικρές αποκλίσεις από τη συνιστώμενη δόση θεραπείας ανά μελίσι μπορεί να επιφέρει τη μη θανάτωση των βαρρόα ή την απώλεια των μελισσοσμηνών. Σε κάθε περίπτωση θα πρέπει να υπολογίζεται με μεγάλη ακρίβεια η ακριβής δόση φαρμάκου που εισέρχεται εντός της κυψέλης σε συνάρτηση, πάντα με βάση το μέγεθος του μελισσοσμήνου και τον τρόπο εφαρμογής της θεραπείας.

1.6.2 Χημική καταπολέμηση

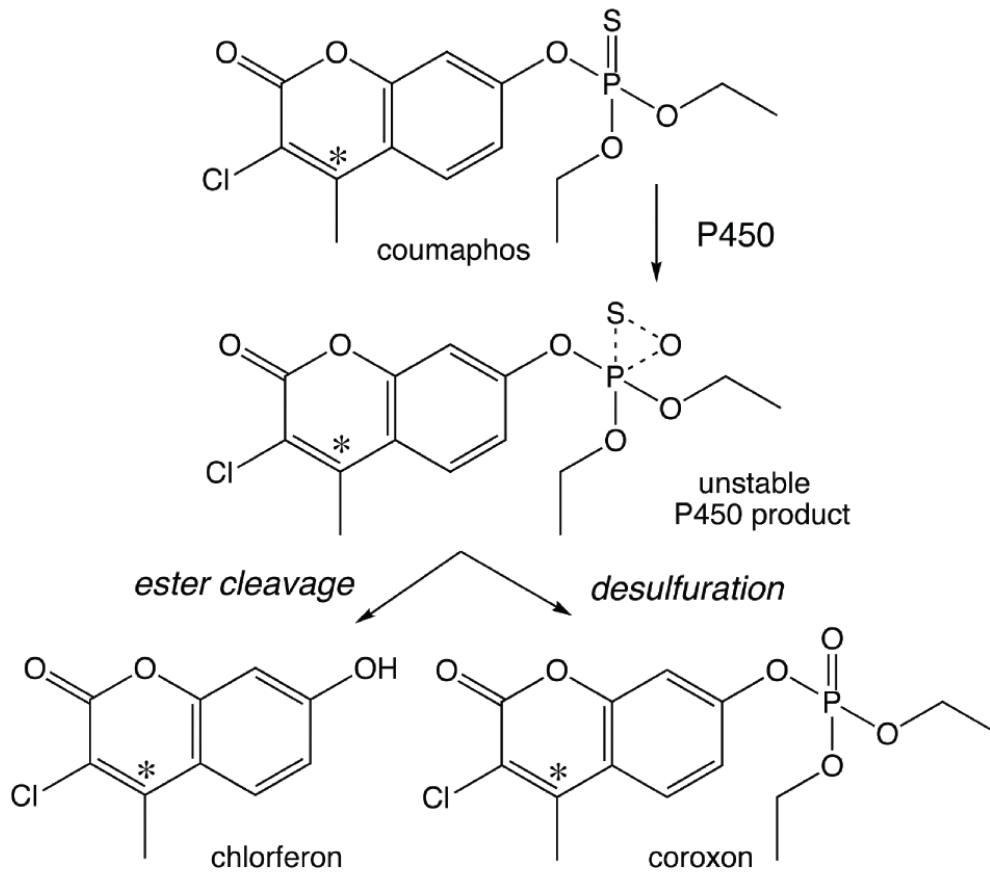
Τα χημικά εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται για τη καταπολέμηση των φυτικών και ζωικών εχθρών ταξινομούνται ανάλογα με το μηχανισμό δράσης τους. Η γενικότερη διάκριση των εντομοκτόνων γίνεται με βάση το στόχο στη φυσιολογία των ζωικών οργανισμών. Πιο συγκεκριμένα, μπορούν να στοχεύσουν το νευρομυϊκό σύστημα, τη μορφολογική και φυσιολογική ανάπτυξη (growth and development), το αναπνευστικό και το μεσεντερικό σύστημα των εντόμων. Παράλληλα, υπάρχουν ομάδες εντομοκτόνων που δεν έχουν εξακριβωθεί πλήρως οι μηχανισμοί δράσης τους, όπως ορισμένα βοτανικά, βακτηριακά και μυκητολογικά παράγωγα. Σύμφωνα με την σχηματική ταξινομητική απεικόνιση του IRAC, διακρίνονται εντομοκτόνα με περισσότερους από 25 διαφορετικούς τρόπους δράσεις και τουλάχιστον 55 διαφορετικές χημικές ομάδες (Εικόνα 1.5) (Sparks & Nauen 2015).



Εικόνα 1.5. Ταξινόμηση των εντομοκτόνων με βάση τον μηχανισμό δράσης σύμφωνα με τον IRAC (<https://irac-online.org/>).

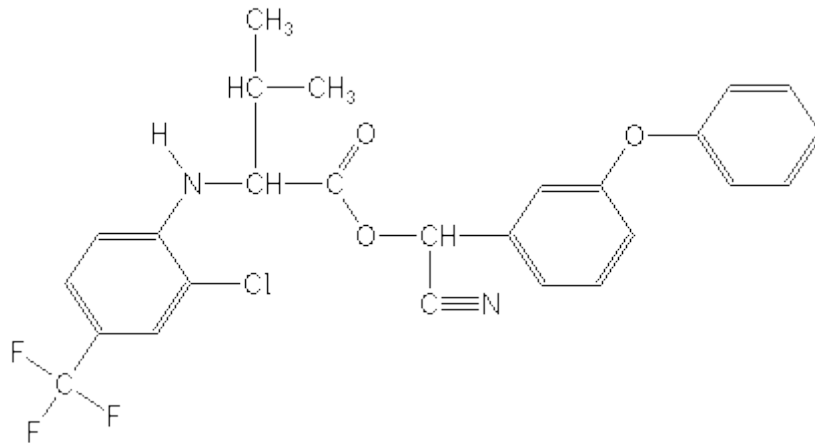
Οι μελισσοκόμοι πραγματοποιούν συχνές παρεμβάσεις στα μελίσσια τους, κυρίως με χημικά μέσα για τη καταπολέμηση του Βαρρόα από μια λίστα διαθέσιμων ακαρεοκτόνων. Τα πιο συχνά συνθετικά ακαρεοκτόνα που χρησιμοποιούνται για τη καταπολέμηση είναι το οργανοφωσφωρικό **Coumaphos**, τα Πυρεθροειδή **Flumethrin** και **tau-fluvalinate**, και το **Amitraz** που ανήκει στην οικογένεια των Φορμαμιδινών. Όλα τα συνθετικά ακαρεοκτόνα που χρησιμοποιούνται για τη καταπολέμηση του Βαρρόα στοχεύουν στο νευρομυϊκό σύστημα του παρασίτου.

Το **Coumaphos** συνθέθηκε πριν από 70 χρόνια για χρήση σε παραγωγικά ζώα, για την καταπολέμηση εκτοπαρασιτικών εντόμων, όπως τα ακάρεα και οι έλμινθες. Το **Coumaphos** είναι ένα οργανοφωσφορικό προεντομοκτόνο (Jeschke 2016) το οποίο απαιτεί βιοενεργοποίηση από κυτοχρωμικές P450 (CYP) μονοοξυγενάσες (MOs). Η κυτοχρωμική P450 με μονοοξείδωση του δεσμού P=S προκαλεί τη δημιουργία των δυο κύριων μεταβολιτών (coroxon, chlorferon) και ενός μη σταθερού P450 προϊόντος. Η εστερική απόσχιση προκαλεί τον μη τοξικό μεταβολίτη chlorferon και η αποθείωση στον φωσφορικό μεταβολίτη coroxon (Coumaphos-oxon), ο οποίος δρα ως ανταγωνιστής και αναστέλλει τη δράση του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) (Εικόνα 1.6) (Vlogiannitis et al. 2021). Η ακετυλοχολίνη (ACh) αποτελεί έναν από τους βασικότερους νευροδιαβιβαστές στους ζωικούς οργανισμούς και η συγκέντρωσή της ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό από το ένζυμο της ακετυλοχολινεστεράσης καθώς καταλύει την υδρόλυση της ακετυλοχολίνης σε χολίνη και ακετυλομάδα. Η αναστολή της δράσης της ακετυλοχολινεστεράσης προκαλεί συσσώρευση της ακετυλοχολίνης στη νευρομυϊκή σύναψη με αποτέλεσμα την υπερβολική αύξηση της συγκέντρωσής της. Η διαταραχή αυτή εμποδίζει τη μετάδοση των νευρικών ώσεων από τις νευρικές απολήξεις στις μυϊκές ίνες. Αυτό οδηγεί σε συνεχή διέγερση του παρασίτου, που οδηγείται σε σπασμούς, παράλυση και καταλήγει σε θάνατο.

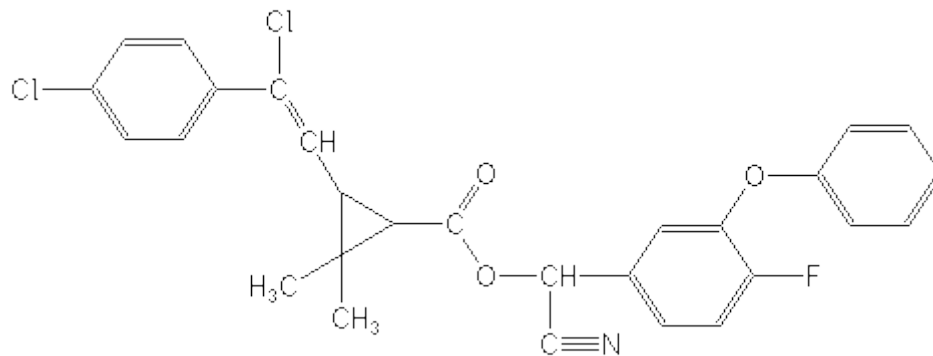


Εικόνα 1.6 : Συντακτικός τύπος και μεταβολισμός του **Coumaphos** στο Varroa (Πηγή:Vlogiannitis et al 2021)

Τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα δρουν στο νευρικό σύστημα των αρθρόποδων και πιο συγκεκριμένα στοχεύουν το κανάλι μεταφοράς ιόντων νατρίου (VGSC), μια μεγάλη διαμεμβανική πρωτεΐνη των νευρικών κυττάρων. Τα πυρεθροειδή αφού προσδεθούν στον στόχο προκαλούν παρατεταμένη εκπόλωση των καναλιών με αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη ροή ηλεκτρονίων. Αυτό οδηγεί σε απώλεια της συντονισμένης νευρωνικής λειτουργίας, που οδηγεί το έντομο σε παράλυση και ακολούθως στον θάνατο (González-Cabrera et al. 2013). Αν και τα περισσότερα πυρεθροειδή παρουσιάζουν υψηλή δραστικότητα κατά των εντόμων και των ακάρεων, ορισμένες ενώσεις με μεγαλύτερες όξινες πλευρικές ομάδες δείχνουν εξαιρετική εκλεκτικότητα για τα ακάρεα και τα τσιμπούρια (González-Cabrera et al. 2013). Τέτοια ακαρεοκτόνα είναι το **tau-fluvalinate** (εικόνα 1.7) και το **flumethrin** (εικόνα 1.8). Η εκλεκτικότητά τους για τη καταπολέμηση των ακάρεων *Varroa* χωρίς να δημιουργούν προβλήματα στις μέλισσες, τα καθιστά χρήσιμα εργαλεία στα χέρια των μελισσοκόμων.



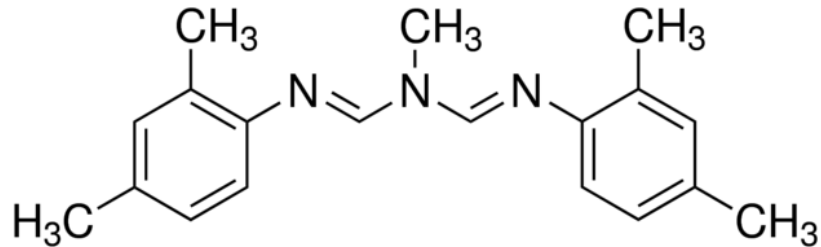
Εικόνα 1.7 : Συντακτικός τύπος του *tau-Fluvalinate* (Πηγή:Fluoride Action Network)



Εικόνα 1.8 : Συντακτικός τύπος του *Flumethrin* (Πηγή:Fluoride Action Network)

Το **Amitraz** (εικόνα 1.9) είναι ακαρεοκτόνο που έχει χρησιμοποιηθεί για την καταπολέμηση κρότωνων και ακάρεων. Το Amitraz ανήκει στη κατηγορία των φορμαμιδινών και είναι προεντομοκτόνο καθώς απαιτεί ενεργοποίηση για τη μετατροπή του στον μεταβολίτη N2-(2,4-Dimethylphenyl)-N1-methylformidine (DPMF) που δρα ως ανταγωνιστής των υποδοχέων οκτοπαμίνης (Kita et al. 2016). Οι υποδοχείς οκτοπαμίνης κατηγοριοποιούνται σε δύο κύριους τύπους: τον α-αδρενεργικό υποδοχέα οκτοπαμίνης (α-adrenergic-like octopamine receptors (αAOR)) και τον β-αδρενεργικό υποδοχέα (β-adrenergic receptor (βAOR)). Μέχρι πρόσφατα υπήρχε η πεποίθηση ότι ο υποδοχέας οκτοπαμίνης-τυραμίνης λειτουργεί ως βιοσυνθετικός πρόδρομος της οκτοπαμίνης αλλά έχει καθιερωθεί ως προσδέτης (ligand) με τους υποδοχείς του συζευμένους με πρωτεΐνη G (G-protein coupled receptors) (Kita et al. 2016). Η εξαιρετικά εκλεκτική δράση του Amitraz έναντι του *Varroa*, σε

συνδυασμό με την εγκεκριμένη χρήση του στη μελισσοκομία, έχουν προκαλέσει την εκτεταμένη εφαρμογή του από τους μελισσοκόμους τα τελευταία χρόνια.



Εικόνα 1.9: Συντακτικός τύπος του **Amitraz** (Πηγή:Sigma Aldrich)

Τα σκευάσματα που περιέχουν τις παραπάνω συνθετικές δραστικές ουσίες δεν επιτρέπονται στην βιολογική μελισσοκομία. Τα ακαρεοκτόνα αυτά εφαρμόζονται κυρίως μέσω εμποτισμένων ταινιών που τοποθετούνται μεταξύ των πλαισίων του γόνου, ούτως ώστε να έρχονται σε επαφή με το Βαρρόα, το οποίο προκειμένου να αναπαραχθεί περιφέρεται στη περιοχή του γόνου (FAO 2020).

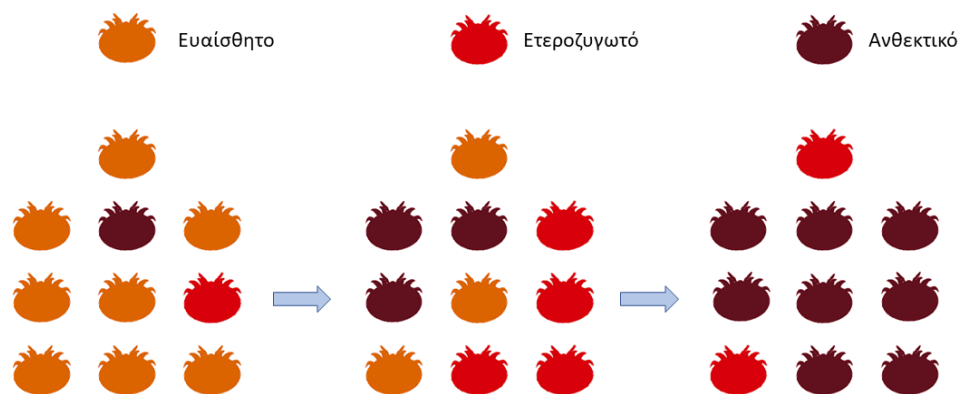
1.7 Η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα/ακαρεοκτόνα

Ανθεκτικότητα είναι μια κληρονομούμενη ιδιότητα και ορίζεται ως η ικανότητα που αναπτύσσουν ορισμένοι οργανισμοί και επιβιώνουν μετά από έκθεση σε δόσεις δραστικής ουσίας που υπό φυσιολογικές συνθήκες θα ήταν θανατηφόρες για αυτούς (Denholm et al. 2002).

Η ανθεκτικότητα είναι μια εξελικτική διαδικασία. Οι μεταλλάξεις που προσδίδουν ανθεκτικότητα είναι πολύ σπάνιες σε έναν πληθυσμό. Όμως, η συχνότητα αυτή αυξάνει όταν ο πληθυσμός βρεθεί υπό πίεση επιλογής, προκαλούμενη από επεμβάσεις με εντομοκτόνα. Καθώς τα ανθεκτικά αλληλόμορφα εδραιωθούν στη πλειοψηφία του πληθυσμού, η αποτελεσματικότητα του εντομοκτόνου φθίνει, συνοδευόμενη από μείωση της παρουσίας των ευαίσθητων αλληλόμορφων (Εικόνα 1.10).

Ως εκ τούτου, η ανθεκτικότητα οδηγεί σε απώλεια της αποτελεσματικότητας των ακαρεοκτόνων. Ένα από τα πιο συνηθισμένα λάθη που κάνουν οι παραγωγοί είναι η αύξηση

της συνιστώμενης δόσης του εκάστοτε φαρμάκου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την άσκηση μεγαλύτερης πίεσης στον εχθρό, άρα την μεγαλύτερη ανάπτυξη ανθεκτικότητας, την μόλυνση των προϊόντων του παραγωγού με επικίνδυνα υπολείμματα φαρμάκων, την μόλυνση του περιβάλλοντος και το αυξημένο ρίσκο θανάτου των μελισσών λόγω τοξικότητας. Αντίθετα, συστήνεται η εναλλαγή φαρμάκων με διαφορετικό τρόπο δράσης ούτως ώστε να εξαλειφθούν τα παράσιτα, πριν προλάβουν να αναπτύξουν σε μια συγκεκριμένη χημική ουσία



Εικόνα 1.10. Σχηματική απεικόνιση ανάπτυξης ανθεκτικών ακάρεων μετά από επεμβάσεις με την ίδια δραστική ουσία.

Οι πληθυσμοί εντόμων παρουσιάζουν ποικίλα επίπεδα ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα με το φαινόμενο της ανθεκτικότητας να είναι εντυπωσιακό, αφού σε πολλές περιπτώσεις απαιτείται ποσότητα εντομοκτόνου έως και χιλιάδες φορές μεγαλύτερη προκειμένου να θανατωθεί ένας πληθυσμός ανθεκτικών παρασίτων, σε σχέση με έναν ευαίσθητο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα φυτικού εχθρού με πολύ ανθεκτικούς πληθυσμούς αποτελεί ο τετράνυχος (*Tetranychus urticae*). Η ένταση του φαινομένου της ανθεκτικότητας στον τετράνυχο είναι ότι ισχυρή που σε πολλές περιπτώσεις χρειάζεται περισσότερες από 5.000 φορές υψηλότερη δόση εντομοκτόνου για να θανατωθεί ένα μέρος του ανθεκτικού πληθυσμού (Paparostolou et al. 2020). Παράλληλα, σε ορισμένες περιπτώσεις πληθυσμών δύναται να παρατηρηθεί ύπαρξη ανθεκτικότητας σε περισσότερα από ένα εντομοκτόνα, χωρίς να έχει προηγηθεί έκθεση σε αυτά. Αυτή η περίπτωση ονομάζεται διασταυρωτή ανθεκτικότητα (Metcalf 1989). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί και το φαινόμενο της πολυανθεκτικότητας σε φυσικούς πληθυσμούς. Σε αυτή τη περίπτωση, ένας πληθυσμός εμφανίζει ανθεκτικότητα σε διάφορα μη σχετικά εντομοκτόνα, εξαιτίας του μηχανισμού

ανθεκτικότητας όπως υπερέκφραση ενζύμων αποτοξικοποίησης (P450s) που μεταβολίζουν και αδρανοποιούν πλήθος μη συγγενών εντομοκτόνων (Pararostolou et al. 2020).

1.7.1 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα έντομα και στα ακάρεα κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τη μορφή τους. Η **φυσιολογική** ή **ηθολογική ανθεκτικότητα** προκαλείται από επιδερμικές διαφοροποιήσεις και αλλαγές στη συμπεριφορά του στόχου, με αποτέλεσμα τη μειωμένη είσοδο του εντομοκτόνου στον οργανισμό (Balabanidou et al. 2019).

Ένας δεύτερος μηχανισμός ανθεκτικότητας είναι η **βιοχημική** ή **μεταβολική ανθεκτικότητα**, η οποία συνίσταται από ένζυμα που μεταβολίζουν και αδρανοποιούν τα εντομοκτόνα προτού αυτά φτάσουν στον στόχο τους εντός του οργανισμού. Βασικά ένζυμα της βιοχημικής ανθεκτικότητας είναι οι εστεράσες, οι μικτής λειτουργίας P450 οξειδάσες και οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης (Katsanou et al. 2022; Vontas et al. 2000, 2001)

Οι εστεράσες (καρβοξυλεστεράσες) είναι μια μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών, μέλη της οποίας δεσμεύουν και μεταβολίζουν εντομοκτόνα μόρια στον εξωκυτταρικό χώρο υδρολύοντας συνήθως αργά εστερικούς δεσμούς (Hemingway & Karunaratne 1998). Οι εστεράσες προκαλούν ανθεκτικότητα σε όλες σχεδόν τις ομάδες εντομοκτόνων, συνηθέστερα όμως στα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμικά. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου η ανθεκτικότητα δημιουργείται εξαιτίας ποιοτικής διαφοροποίησης εστερασών, αποτέλεσμα επιλογής ενζύμων με αυξημένη καταλυτική ικανότητα για τα εντομοκτόνα μόρια. Συνήθως όμως η ανθεκτικότητα οφείλεται σε υπερέκφραση των υπεύθυνων γονιδίων για τη παραγωγή των εστερασών που μεταβολίζουν και αδρανοποιούν τα εντομοκτόνα (Guillemaud et al. 1999; Vontas et al. 2000).

Μια άλλη σημαντική οικογένεια πρωτεϊνών είναι οι οξειδάσες μικτής λειτουργίας P450 (CYPs) ή κυτοχρώματα P450 και δρουν ως μονοοξυγενάσες. Πρόκειται για μικροσωμικές αιμοπρωτεΐνες που καταλύουν την οξειδωτική διάσπαση των εντομοκτόνων (Scott 1999). Για την μειωμένη ευαισθησία των εντόμων ευθύνονται ποσοτικές και σπανίως ποιοτικές αλλαγές μελών της οικογένειας CYPs που έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν τα μόρια των εντομοκτόνων ουσιών (Scott 1999; Vlogiannitis et al. 2021). Διάφορες μελέτες ότι οι CYPs είναι υπεύθυνες για την ανθεκτικότητα σε όλες σχεδόν τις ομάδες εντομοκτόνων.(Nauen et

al. 2022; Riga et al. 2014; Zhou et al. 2020). Συχνά έχουν ευρύ χαρακτήρα (πολλαπλή ανθεκτικότητα), αφού ορισμένες P450 οξειδάσες έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν ως υπόστρωμα και να μεταβολίζουν τοξικά μόρια από διαφορετικές ομάδες (Daborn et al. 2002).

Οι μεταφοράσες ή τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs) αποτελούν μια υπερ-οικογένεια ενζύμων, με σημαντικό ρόλο στη μεταβολική ανθεκτικότητα των εντόμων. Τα ένζυμα αυτά καταλύουν τη σύζευξη του τριπεπτιδίου γλουταθειόνης (GSH) στο λιπόφιλο μόριο των εντομοκτόνων, δημιουργώντας υδατοδιαλυτά προϊόντα μειωμένης τοξικότητας, διευκολύνοντας κατ'αυτόν τον τρόπο την αποβολή τους από τον οργανισμό. Οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης προκαλούν σχετικά ήπια επίπεδα ανθεκτικότητας σε όλες σχεδόν τις κατηγορίες εντομοκτόνων (Vontas et al. 2001).

Οι προαναφερθέντες μηχανισμοί ανθεκτικότητας συντελούν στην μείωση της ποσότητας του εντομοκτόνου που φτάνει τελικά στον στόχο. Ωστόσο, ο μηχανισμός ανθεκτικότητας που συχνά προκαλεί και τα μεγαλύτερα επίπεδα ανθεκτικότητας, είναι μοριακές τροποποιήσεις (μεταλλαγές) στη δομή των πρωτεϊνών στόχων με αποτέλεσμα τη μείωση ή την απώλεια της αποτελεσματικότητας των εντομοκτόνων. Αυτός ο μηχανισμός ονομάζεται ανθεκτικότητα στόχου. (Khajehali et al. 2009).

Η πρώτη αναφορά ανθεκτικότητας στόχου στα έντομα έγινε το 1964 και αφορούσε τη μειωμένη ενεργότητα στο ένζυμο της ακετυλοχολινεστεράσης, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανθεκτικότητας του τετράνυχου στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα. Έκτοτε ο μηχανισμός αυτός ταυτοποιήθηκε σε πολλά έντομα και ακάρεα. Είναι πλέον γνωστό ότι σημειακές μεταλλαγές στην AChE, περιορίζουν τη δράση των οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών εντομοκτόνων και επιφέρουν ανθεκτικότητα (Khajehali et al. 2009; Zhu et al. 1996). Είναι γνωστό ότι αλλαγές στις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς ιόντων νατρίου και χλωρίου μειώνουν την ικανότητα των εντομοκτόνων να προσδεθούν με τις πρωτεΐνες στόχους, με αποτέλεσμα την μείωση της ευαισθησίας των εντόμων. Συνήθως, οι μεταλλαγές αυτές παρουσιάζονται ιδιαίτερα συντηρημένες και προσδίδουν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα που στοχεύουν στα πρωτεϊνικά αυτά κανάλια, όπως τα πυρεθροειδή (Hubert et al. 2014; Zhao et al. 2014).

1.8 Η ανθεκτικότητα του Βαρρόα στα ακαρεοκτόνα

Η εκτεταμένη χρήση των διαθέσιμων ακαρεοκτόνων, σε συνδυασμό με τον μικρό αριθμό διαθέσιμων επιλογών και την πίεση που ασκείται σε ένα κλειστό κύκλωμα όπως η κυψέλη όπου τα Βαρρόα έρχονται σε συνεχή επαφή με τη δραστική ουσία, έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανθεκτικότητας παγκοσμίως (Maggi et al. 2017). Αυτό συμβαίνει επειδή οι χημικές ουσίες σκοτώνουν τα ευαίσθητα παράσιτα επιτρέποντας παράλληλα στα ανθεκτικά να πολλαπλασιαστούν και να επικρατήσουν στο περιβάλλον (Εικόνα 1.10) καθώς τα φάρμακα δημιουργούν εξελικτική πίεση που ευνοεί την επικράτηση ανθεκτικών πληθυσμών/στελεχών. Οι βασικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας του Βαρρόα στα εντομοκτόνα/ακαρεοκτόνα αφορούν (α) διαφοροποιήσεις στη δομή των πρωτεϊνών-στόχων των εντομοκτόνων συνήθως εξαιτίας σημειακών μεταλλαγών που εμποδίζουν τη πρόσδεση των εντομοκτόνων και (β) τροποποιήσεις στη παραγωγή ενζύμων αποτοξικοποίησης τα οποία δεσμεύουν και μεταβολίζουν τις χημικές ουσίες πριν αυτές φτάσουν στους υποκυτταρικούς στόχους τους. Οι μηχανισμοί που έχει αναπτύξει το παράσιτο έναντι των σκευασμάτων που χρησιμοποιούνται είναι διαφορετικοί και εξαρτώνται από τον τρόπο δράσης της εκάστοτε χημικής ουσίας.

Τα **οργανοφωσφορικά** ακαρεοκτόνα χρησιμοποιήθηκαν εκτεταμένα για τον περιορισμό του παρασίτου μετά την είσοδο του στην Ελλάδα, με κύριο εκπρόσωπο το μαλάθειο (Θρασυβούλου 2005). Η απαγόρευση της χρήσης του Μαλάθειου στη μελισσοκομία, συνοδεύτηκε με την έγκριση του Coumaphos. Η εκτεταμένη χρήση του **Coumaphos** από τους μελισσοκόμους για τη θεραπεία της βαρροϊκής ακαρίασης είχε ως αποτέλεσμα την καταγραφή περιστατικών ανθεκτικότητας του Βαρρόα στο Coumaphos σε διάφορες περιοχές παγκοσμίως, όπως στις Η.Π.Α και στην Αργεντινή (Maggi et al. 2009; Pettis 2004). Επίσης, πρόσφατη μελέτη που δημοσιεύτηκε στην Ισπανία αναφέρει μειωμένη αποτελεσματικότητα σε μελίτσια από διάφορες περιοχές της χώρας, ύστερα από επέμβαση με σκευάσματα που περιείχαν Coumaphos (Hernández-Rodríguez et al. 2021). Παρόλα αυτά ο μηχανισμός ανθεκτικότητας του *V.destructor* στο Coumaphos δεν ήταν μέχρι πρόσφατα γνωστός. Η μεταβολική ανθεκτικότητα με αποτοξικοποίηση του Coumaphos λόγω του αυξημένου μεταβολισμού του Κοροχον, στο άκαρι *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, έχει αναφερθεί πως προσδίδει ανθεκτικότητα του ακάρεος στο Coumaphos (Bull & Ahrens 1988;

Li et al. 2003). Στην Ελλάδα, η πρώτη αναφορά για ανθεκτικότητα του Βαρρόα στο Coumaphos έγινε από Vlogiannitis et al. 2017.

Τα **πυρεθροειδή** ακαρεοκτόνα ήταν τα πρώτα που χρησιμοποιήθηκαν από τους μελισσοκόμους για την αντιμετώπιση και διαχείριση του Βαρρόα. Όμως η επαναλαμβανόμενη και αλόγιστη χρήση τους οδήγησε σε φαινόμενα ανθεκτικότητας που συνοδεύτηκαν με αποτυχίας ελέγχου του παρασίτου. Στην Ιταλία, εμφανίστηκε ανθεκτικότητα του *Varroa* στα πυρεθροειδή, μόλις μετά από 4 χρόνια χρήσης (Hubert et al. 2014; Milani 1995). Από την Ιταλία, ανθεκτικά ακάρεα διαδώθηκαν στην Ευρώπη, με επιβεβαιωμένη ανίχνευση αυτών στο Βέλγιο το 1997 (Martin 2004). Παρότι, υπήρξε αναφορά για ανθεκτικότητα του Βαρρόα στο πυρεθροειδές tau-fluvalinate στο Ισραήλ και συνδέθηκε με μειωμένη έκθεση των Βαρρόα στη δ.ο, μέσω αυξημένου ρυθμού (20 φορές) της ενεργότητας μονοοξυγονασών (Mozes-Koch et al. 2000), ο πιο συχνά αναφερόμενος μηχανισμών ανθεκτικότητας αρθρώπων στα πυρεθροειδή ακαρεοκτόνα αφορά αντικαταστάσεις στο κανάλι μεταφοράς ιόντων νατρίου (VGSC), τον υπομοριακό στόχο των πυρεθροειδών (Dong et al. 2014). Ο μηχανισμός ανθεκτικότητας του πυρεθροειδούς **tau-fluvalinate** στο *V.destructor* συσχετίστηκε με σημειακές μεταλλαγές στη θέση 925 του VGSC.

Οι σημειακές μεταλλαγές στη θέση πρόσδεσης του υπομοριακού στόχου των πυρεθροειδών (κανάλι μεταφοράς ιόντων νατρίου) οδηγούν σε αδυναμία πρόσδεσης του εντομοκτόνου στον στόχο με αποτέλεσμα να μειώνεται η αποτελεσματικότητα του. Ο μηχανισμός ανθεκτικότητας του *Varroa destructor* στο tau-Fluvalinate έχει συσχετιστεί με μεταλλαγές στη θέση L925 (González-Cabrera et al. 2013). Αρκετές περιπτώσεις της αντικατάστασης από Λευκίνη σε Βαλίνη (L925V) έχουν αναφερθεί στο Ηνωμένο Βασίλειο (González-Cabrera et al. 2016), στη Τσεχία (Hubert et al. 2014) και στην Ελλάδα (Alissandrakis et al. 2017). Η αντικατάσταση σε Ισολευκίνη (L925I) έχει βρεθεί στην Ελλάδα (Alissandrakis et al. 2017) και στις νοτιοδυτικές ΗΠΑ (González-Cabrera et al. 2016), ενώ η αντικατάσταση σε Μεθειονίνη (L925M) έχει αναφερθεί στις ΗΠΑ (Millán-Leiva et al. 2021a), στην Ιαπωνία (Ogihara et al. 2021) και στις Κανάριες Νήσους (Ισπανία) (Millán-Leiva et al. 2021b). Η πρώτη αναφορά για τη παρουσία μεταλλαγών ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή ακαρεοκτόνα, στην Ελλάδα, έγινε από Alissandrakis et al. 2017, όπου εντοπίστηκαν οι αντικαταστάσεις L925V και L925I, σε δείγματα Βαρρόα από διάφορες περιοχές της χώρας.

Το Amitraz που ανήκει στην οικογένεια των **φορμαμιδινών** είναι η μόνη δ.ο αυτής της οικογένειας ακαρεοκτόνων με έγκριση για χρήση στη μελισσοκομία. Όπως συμβαίνει συνήθως από τη συχνή και εντατική χρήση των εντομοκτόνων, οι πληθυσμοί *Varroa*

έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στο Amitraz. Η ανθεκτικότητα αυτή έχει αποδοθεί σε μεταλλάξεις στη θέση στόχου, σε συγκεκριμένες θέσεις του β-αδρενεργικού υποδοχέα της οκτοπαμίνης (Hernández-Rodríguez et al. 2021). Αυτές οι υποκαταστάσεις αμινοξέων μειώνουν την ικανότητα δέσμευσης του μεταβολίτη DPMF στον β-αδρενεργικό υποδοχέα οκτοπαμίνης, μειώνοντας έτσι την τοξική τους δράση. Η πρώτη συσχέτιση μεταξύ μεταλλάξεων στον συγκεκριμένο υποδοχέα και ανθεκτικότητας στο Amitraz περιγράφηκε πρώτη φορά στο παρασιτικό άκαρι *Varroa destructor* από τους Hernández-Rodríguez et al. 2021, όπου οι μεταλλάξεις N87S και Y215H εμφανίστηκαν σε πληθυσμούς *Varroa* που είχαν επιβιώσει από θεραπευτικές επεμβάσεις πεδίου με σκεύασμα που περιείχε Amitraz και συνδέθηκαν με ανθεκτικότητα σε αυτή τη δ.ο. Η μεταλλαγή N87S προκύπτει από σημειακή αντικατάσταση της ασπαραγίνης (AAT) σε σερίνη (367 AGT) στη θέση 87 του β-αδρενεργικού υποδοχέα οκτοπαμίνης, ενώ η μεταλλαγή Y215H είναι αποτέλεσμα σημειακής αντικατάστασης της τυροσίνης (TAT) σε ιστιδίνη (643 CAT) στον ίδιο υποδοχέα. Επίσης παρά την παρατεταμένη και εκτεταμένη χρήση του Amitraz, δεν υπάρχουν αναφορές ανθεκτικότητας του Βαρρόα στο Amitraz στην Ελλάδα.

1.9 Σκοπός της μελέτης

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η ανίχνευση ανθεκτικότητας και η διερεύνηση των υπεύθυνων μοριακών μηχανισμών ανθεκτικότητας στα ακαρεοκτόνα και της συχνότητας τους σε πληθυσμούς του *Varroa destructor* (Βαρρόα) από την Ελλάδα και το Βέλγιο. Επιπλέον μελετήθηκε η εκλεκτική δράση διάφορων βιοεντομοκτόνων έναντι του *Varroa destructor*. Η εργασία χωρίζεται σε τέσσερα κεφάλαια:

1. Διερεύνηση των επιπέδων και χαρακτηρισμός του μηχανισμού της ανθεκτικότητας του Βαρρόα στο *Coumaphos*.
2. Ανίχνευση και παρακολούθηση ανθεκτικότητας στόχου σε πυρεθροειδή πληθυσμών Βαρρόα από περιοχές της Ελλάδας και του Βέλγιου, με μοριακά διαγνωστικά.
3. Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας του Amitraz σε πληθυσμούς Βαρρόα από διάφορες περιοχές της Ελλάδας καθώς και σε ανθεκτικούς πληθυσμούς σε άλλα ακαρεοκτόνα.
4. Αξιολόγηση βιοεντομοκτόνων φυσικής προέλευσης ως προς την δράση τους έναντι του *Varroa destructor* καθώς και σε ανθεκτικούς πληθυσμούς σε άλλα ακαρεοκτόνα.

Κεφάλαιο 2. Διερεύνηση των επιπέδων και χαρακτηρισμός του μηχανισμού της ανθεκτικότητας του βαρρόα στο *Coumaphos*

2.1 Περίληψη

Το *Varroa destructor* αποτελεί ένα από τα κυριότερα προβλήματα της σύγχρονης μελισσοκομίας. Υψηλής εκλεκτικότητας ακαρεοκτόνα με χαμηλή τοξικότητα για τις μέλισσες χρησιμοποιούνται διεθνώς για τον έλεγχο του παρασίτου. Ένα από τα πιο σημαντικά ακαρεοκτόνα είναι το οργανοφωσφορικό (OP) προ-εντομοκτόνο *Coumaphos* που γίνεται τοξικό μετά από ενζυμική ενεργοποίηση εντός του Βαρρόα. Μετά από βιοδοκιμές που πραγματοποιήθηκαν, βρέθηκε ένας πληθυσμός Βαρρόα από το νησί της Άνδρου (AN-CR) που εμφάνισε υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στο *Coumaphos*. Η ανθεκτικότητα δεν είναι αποτέλεσμα μειωμένης εισρόφησης του ακαρεοκτόνου, ανθεκτικότητα σημείου-στόχου ή αυξημένης αποτοξικοποίησης. Ο κύριος μηχανισμός ανθεκτικότητας είναι η μειωμένη ενεργοποίηση του *Coumaphos* από ένα ένζυμο του κυτοχρώματος P450. Ένας ισχυρός και σπάνιος εξελικτικός μηχανισμός ανθεκτικότητας που είναι αποτέλεσμα της άσκησης πίεσης με το ακαρεοκτόνο. Μετά την έκθεση σε υποθανάτιες δόσεις [¹⁴C] *Coumaphos*, το εκχύλισμα ευαίσθητων ακάρεων περιείχε σημαντικές ποσότητες *Coroxon*, που αποτελεί τον ενεργοποιημένο μεταβολίτη του *Coumaphos*, ενώ στα ανθεκτικά ακάρεα ανιχνεύτηκε ελάχιστη ποσότητα. Αυτό υποδεικνύει καταστολή της ενζυματικής ενεργοποίησης του ακαρεοκτόνου που με βάση από τη βιβλιογραφία γίνεται από οξειδάσες Cytochrome P450s στα ανθεκτικά ακάρεα. Έγιναν βιοδοκιμές με το *Coroxon* προκειμένου να παρακάμψουμε το στάδιο της ενεργοποίησης του ακαρεοκτόνου και η ανθεκτικότητα μειώθηκε εντυπωσιακά. Υπάρχουν 26 κυτοχρωμικές P450s στο γονιδίωμα του *V. Destructor*. Η μεταγραφική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε μας εμφάνισε μειωμένα έκφραση των *CYP3012A6* και *CYP4EP4* στα ανθεκτικά Βαρρόα. Με τη τεχνική *RNAi* μειώθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της *CYP4EP4* στα ευαίσθητα άτομα με αποτέλεσμα να παρεμποδιστεί η ενεργοποίηση του *Coumaphos* και να δημιουργηθεί ανθεκτικότητα.

2.2 Εισαγωγή

Τα οργανοφωσφορικά ακαρεοκτόνα ήταν από τα πρώτα όπλα στη φαρέτρα των μελισσοκόμων έναντι του καταστρεπτικού παρασίτου Βαρρόα. Αρχικά το μαλάθειο (δ.ο Malathion) και στη συνέχεια σκευάσματα με δ.ο το *Coumaphos* χρησιμοποιήθηκαν για την καταπολέμηση του παρασίτου. Η απαγόρευση του Malathion για χρήση στη μελισσοκομία είχε ως αποτέλεσμα την αποκλειστική χρήση του *Coumaphos* από τα οργανοφωσφορικά ακαρεοκτόνα. Οι μελισσοκόμοι αξιοποιώντας την επιλεκτική δράση του *Coumaphos*, δηλαδή την ικανότητα του να σκοτώνει συγκεκριμένα έντομα-στόχους την ώρα που παρασιτούν οργανισμούς μη-στόχους κατάφεραν να περιορίσουν τον παρασιτισμό από το Βαρρόα.

Καταγεγραμμένα περιστατικά ανθεκτικότητας του Βαρρόα στο *Coumaphos* υπάρχουν στις ΗΠΑ και στην Αργεντινή (Maggi et al. 2008; Pettis 2004) ενώ μέχρι στιγμής είχε αναφερθεί ανθεκτικότητα του ακάρεος *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* στο *Coumaphos* (Bull & Ahrens 1988; Li et al. 2003), λόγω αυξημένης αποτοξικοποίησης του μεταβολίτη *Coroxon* (Εικόνα 2.1).

Ο χαρακτηρισμός των μηχανισμών ανθεκτικότητας του Βαρρόα στα ακαρεοκτόνα, παρεμποδίστηκε λόγω του βιολογικού κύκλου του ακάρεος εντός της κυψέλης (Van Leeuwen et al. 2010) και της έλλειψης πληροφοριών σχετικά με το γονιδίωμα του παρασίτου. Όμως η πρόσφατη δημοσίευση της γονιδιωματικής αλληλουχίας του Βαρρόα μας παρέχει τη δυνατότητα της καλύτερης μελέτης της ανθεκτικότητας μέσω της μοριακής βιολογίας. Η ανάπτυξη γενετικών εργαλείων (RNAi) (Campbell et al. 2010) διευκολύνει τις λειτουργικές μελέτες για την εξακρίβωση της εμπλοκής συγκεκριμένων γονιδίων σε ανθεκτικούς φαινότυπους.

2.3 Υλικά και Μέθοδοι

2.3.1 Χημικές ουσίες και ¹⁴C-coumarphos

Οι παρακάτω δραστικές ουσίες χρησιμοποιήθηκαν για τις βιοδοκιμές: *Coumarphos* 98% καθαρότητα (Sigma Aldrich, Ελλάδα), *malaoxon, coumarphos-oxon* 96%(LGC Standards, UK), *3-Chloro-7-hydroxy-4-methylcoumarin (chlorferon)* 97% καθαρότητα, (Sigma Aldrich, Ελλάδα).

Το ραδιοσημασμένο *Coumarphos* [coumarin-4-¹⁴C] (Εικόνα 1.6) υψηλής χημικής και ραδιοχημικής καθαρότητας (>99%) αποκτήθηκε από την εταιρεία Institute of Isotopes Co.,Ltd. (Izotop, Ουγγαρία). Η ειδική ενεργότητα του [¹⁴C] *coumarphos* ήταν 2.024 MBq/mg (1MBq=60X10⁶ dpm).

2.3.2 Βιολογικό υλικό (πληθυσμοί *Varroa*)

Συλλέχθηκαν πληθυσμοί Βαρρόα από διάφορες περιοχές της χώρας και μεταφέρθηκαν στον χώρο του εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Μεταξύ αυτών υπήρξε και ένας πληθυσμός από το νησί της Άνδρου που συλλέχθηκε από ένα μελισσοκομείο όπου γινόταν εκτεταμένη χρήση της δ.ο *coumarphos* τα τελευταία 14 χρόνια, με αποτέλεσμα να γίνει αναφορά για αποτυχία αντιμετώπισης του παρασίτου (συντομογραφία AN-CR, Andros Coumarphos Resistant). Επίσης συλλέχθηκε ένας ακόμα πληθυσμός από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών και χαρακτηρίστηκε ως ευαίσθητος καθότι είχε διατηρηθεί χωρίς χημική καταπολέμηση τουλάχιστον για τα τελευταία 20 χρόνια (συντομογραφία ATH-S, Athens Susceptible). Για τη δειγματοληψία των Βαρρόα πήραμε από κάθε κυψέλη, πλαίσια με σφραγισμένο γόνο και τα μεταφέραμε στο χώρο του εργαστηρίου. Με τη βοήθεια μιας λαβίδας αφαιρέσαμε το κέρινο κάλυμμα από μερικά κελιά σφραγισμένου γόνου και σύραμε έξω τη προνούμφη. Ύστερα με τη βοήθεια ενός πινέλου συλλέξαμε τα *Varroa* που βρίσκονταν είτε πάνω στη προνούμφη, είτε μέσα στο κελί και τα τοποθετήσαμε μέσα σε ένα τρυβλίο, στο οποίο θα έχει τοποθετηθεί υγρό κομμάτι χαρτιού ώστε να μην αφυδατωθούν τα *Varroa*, μέχρι την εργαστηριακή εξέταση τους.

2.3.3 Βιοδοκιμές

Η δ.ο *Coumaphos* διαλύθηκε με τη χρήση του οργανικού διαλύτη Ακετόνη με στόχο τη δημιουργία διαλύματος υψηλής συγκέντρωσης (Stock Solution) και το οποίο διατηρήθηκε σε θερμοκρασία -20°C . Πριν τη πραγματοποίηση των βιοδοκιμών παρασκευάζονταν φρέσκα διαλύματα διαφόρων συγκεντρώσεων και ποσότητα 0.5 mL διαλύματος από κάθε συγκέντρωση τοποθετούταν εντός ξεχωριστών γυάλινων φιαλιδίων (Vials). Τα vials περιστρέφονταν ούτως ώστε να διαμοιραστεί ομοιόμορφα εντός αυτών η δ.ο. Καθώς η ακετόνη εξατμιζόταν, δημιουργήθηκε ένα λεπτό στρώμα εντομοκτόνου από την εσωτερική επιφάνεια των vials. Στη συνέχεια, ομάδες των 10 ατόμων ενήλικων Βαρρόα, τοποθετήθηκαν εντός των εμποτισμένων vials και σφραγίζονταν με το ειδικό πώμα. Σε κάθε περίπτωση τα vials τοποθετήθηκαν εντός επωαστικού θαλάμου, σε συνθήκες σκότους, στους 25°C για 20 ώρες. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν Βαρρόα που τοποθετήθηκαν σε εμποτισμένο vial με ακετόνη. Για την ανάλυση έκφρασης των γονιδίων που περιγράφεται παρακάτω, χρησιμοποιήθηκαν βιοδοκιμές με σκοπό την έκθεση των ανθεκτικών Βαρρόα στην LC_{50} συγκέντρωση (200 mg/L). Μετά το τέλος της βιοδοκιμής, τα «εκτεθειμένα» Βαρρόα συλλέχθηκαν και χαρακτηρίστηκαν ως (tAN-CR). Μετά το πέρας των 20 ωρών, πραγματοποιούταν καταμέτρηση της θνησιμότητας των ακάρεων. Ως νεκρά χαρακτηρίζονταν τα ακάρεα τα οποία δεν μπορούσαν να περπατήσουν μετά το ελαφρύ ακούμπημα με πινέλο. Απόρροια των αποτελεσμάτων ήταν η δημιουργία καμπύλης τοξικότητας για την εκάστοτε δ.ο. Τα αποτελέσματα τοξικότητας αναλύθηκαν με τη χρήση του προγράμματος PoloPC (LeoRA, Software, Berkeley, CA, USA). Οι συντελεστές ανθεκτικότητας (Resistance Ratio – RR) υπολογίστηκαν διαιρώντας το LC_{50} του προς εξέταση πληθυσμού με το LC_{50} του ευαίσθητου πληθυσμού/αναφοράς (ATH-S).

2.3.4 Προσδιορισμός ενεργότητας ενζύμων αποτοξικοποίησης και παρεμπόδισης της Ακετυλοχολινεστεράσης

**Μέρος της μελέτης των βιοχημικών μηχανισμών ανθεκτικότητας του Βαρρόα, προέρχεται από τη μεταπτυχιακή διατριβή μου «Ανάλυση της ανθεκτικότητας του βαρρόα, Varroa destructor (Acari : Varroidae) σε ακαρεοκτόνα- Σπυρίδων Βλογιαννίτης, Αθήνα 2016»*

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

Η ενζυμική ενεργότητα των καρβοξυλεστερασών (CCEs), P450 μονοοξυγενασών (MOs), τρανσφερασών της γλουταθειόνης (GSTs) μετρήθηκαν σύμφωνα με τον Van Leeuwen et al. (2005) με μερικές τροποποιήσεις. Αρχικά, έγινε ομογενοποίηση των δειγμάτων συνθλίβοντας 1-10 ενήλικα ακάρεα Βαρρόα σε Sodium Phosphate Buffer (0.1M, pH 7.2, 200μl) με τη χρήση ενός εξαρτήματος (Teflon pestle). Το ομογενοποίημα φυγοκεντρήθηκε στα 5000g, 4 °C για 5' για την κατακρήμνιση των αδιάσπαστων τμημάτων του ακάρεως και το υπερκείμενο συλλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε ως ενζυμική πηγή.

Έγινε μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης με μέθοδο Bradford στα 595nm end point. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 10-20 μg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον 3-5 επαναλήψεις για κάθε πληθυσμό και για κάθε πείραμα. Ο φθορισμός και η απορρόφηση μετρήθηκαν με το φασματοφωτόμετρο TECAN SpectraFluor microplate reader (Molecular Devices).

2.3.4.1 Μέτρηση ενεργότητας ενζυμικών συστημάτων

2.3.4.1.1 Ακετυλοχολινεστεράση

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

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

Το IC50 δηλαδή η συγκέντρωση αναστολέα που παρεμποδίζει το 50% του ενζύμου (IC50) εκφράζεται σε μg/ml προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα

ανάλυσης δεδομένων GraFit version 3.0, Erithacus Software Ltd., Staines, U.K (Leatherbarrow 1992).

2.3.4.1.2 Τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs)

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

A) CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene)

Η αντίδραση αποτελούταν από 10-20μg πρωτεΐνης ομογενοποιημένου, 9.9μl 10mM GSH, 9.9μl 3mM CDNB και 0.1M Sodium Phosphate Buffer (SPB) pH:6.5. Στον μάρτυρα αντί ομογενοποιημένου χρησιμοποιήθηκε 0.1M SPB pH:6.5. Οι διαφορές στην απορρόφηση μετρήθηκαν κινητικά (για 10') στα 340nm σε φωτόμετρο. Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε μmol δεσμευμένου CDNB/min/mg.

B) Monochlorobimane (MCB)

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 200μl, αποτελούμενος από 15-30μg πρωτεΐνης ομογενοποιημένου, 0.003 mM MCB, 3mM GSH και Tris/HCl PH:7.5 buffer. Στον μάρτυρα αντί ομογενοποιημένου χρησιμοποιήθηκε 0.1M SPB PH:6.5. Η μικροπλάκα επώαστηκε στους 22°C για 20 λεπτά και ο φθορισμός υπολογίστηκε στο φωτόμετρο με excitation στα 380nm και emission στα 465nm σε endpoint assay. Η ενεργότητα των GSTs εκφράζεται ως μονάδες φθορισμού ανά μικρογραμμάρια πρωτεΐνης (RFU/μg).

2.3.4.1.3 Εστεράσες

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

α) p-nitrophenol (PNPA)

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

β) 1-naphthyl acetate (1-NA) και 1-naphthyl acetate (2-NA).

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

2.3.4.1.4 P450s οξειδάσες

Η μέτρηση της ενεργότητας των P450s οξειδασών έγινε με το ενζυμικό υπόστρωμα 7-Ethoxycoumarin (7-EC) και NADPH σε συγκεντρώσεις 1mM και 1,25mM αντίστοιχα. Σε 50-100 μg πρωτεΐνης από το ομογενοποίημα έγινε προσθήκη 0,1M SPB PH:7,2, 1,25mM NADPH, 1mM 7-EC) σε πηγαδάκια της μικροπλάκας. Στον μάρτυρα αντί ομογενοποιήματος χρησιμοποιήθηκε 0,1 M SPB PH:7,2 και αντί του υποστρώματος 7-EC το DMSO. Η μικροπλάκα παρέμεινε για επώαση για 30 λεπτά, σε συνθήκες σκότους (καλυμμένη με φύλλο αλουμινίου). Μετά από επώαση 10 λεπτά στους 25 $^{\circ}\text{C}$ η αντίδραση σταμάτησε με προσθήκη διαλύματος 50% ακετονιτρίλιου σε Trizma base buffer (50mM, pH 7,5). Η ποσότητα της 7 hydroxycoumarin που ελευθερώνεται κατά την επώαση υπολογίζεται στο φωτόμετρο στα 465nm με excitation στα 390nm. Η ειδική ενεργότητα των P450 καθορίστηκε χρησιμοποιώντας μια πρότυπη καμπύλη 7-OH coumarin και εκφράστηκε σε pmole 7OH/min/mg protein.

Όλα τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τη Sigma Aldrich (Steinheim, Germany).

2.3.4.2 Διαχωρισμός εστερασών με βάση το ισοηλεκτρικό σημείο (pI)

Αρχικά καθορίστηκε η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο δείγμα με μέθοδο Bradford. Στη συνέχεια εκχύλισμα των συνολικών πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση της ενεργότητας εστερασών σε 1-naphthyl acetate (1-NA), με διαχωρισμό με βάση το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) των πρωτεϊνών που πραγματοποιήθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης (IsoElectric Focusing – IEF) (Invitrogen, Groningen, The Netherlands).

Έγινε ομογενοποίηση των δειγμάτων συνθλίβοντας 1 ενήλικο άκαρι Βαρρόα σε 30 μ L Tissue Protein Extraction Buffer (ThermoFisher) με τη χρήση ενός εξαρτήματος (Teflon pestle). Το ομογενοποίημα φυγοκεντρήθηκε στα 10.000g , 4 °C για 10' για την κατακρήμνιση των αδιάσπαστων τμημάτων του ακάρεως και το υπερκείμενο συλλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε ως ενζυμική πηγή.

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης με μέθοδο Bradford στα 595nm end point. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 10 μ g πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον 3-5 επαναλήψεις για κάθε πληθυσμό και για κάθε πείραμα. Ο φθορισμός και η απορρόφηση μετρήθηκαν με το φασματοφωτόμετρο TECAN SpectraFluor microplate reader (Molecular Devices).

Το κάθε δείγμα Βαρρόα που χρησιμοποιήθηκε είχε τελικό όγκο Ντελ = 10 μ L και περιεκτικότητα 10 μ g πρωτεΐνης ενώ το τελικό δείγμα που φορτώθηκε στο IEF gel (pH 3-10) με χρήση πιπέτας αποτελούταν από 10 μ L δείγματος και 10 μ L Novex IEF Sample Buffer (ThermoFisher). Ως εκ τούτου ο τελικός όγκος ήταν 20 μ L δείγματος.

Η ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης (IsoElectric Focusing – IEF) σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου πραγματοποιήθηκε στις ακόλουθες συνθήκες ούτως ώστε το μείγμα των πρωτεϊνών να ηλεκτροφορηθεί σε μια βαθμίδωση pH 3-10:

- Τάση ρεύματος 100 V για 1 h
- Τάση ρεύματος 200 V για 1 h
- Τάση ρεύματος 500 V για 30'

Στη συνέχεια το gel τοποθετήθηκε σε τρυβλίο petri και ακολούθησε έκπλυση με Sodium Phosphate Buffer (0.1M , PH=7.6) και προσθήκη 80 mg Fast Blue B Salt (Sigma Aldrich) για χρώση των διαχωρισμένων εστερασών πάνω στο IEF gel. Τέλος προστέθηκαν 5mL 1-Naphthyl acetate και το τρυβλίο μεταφέρθηκε σε συνθήκες σκότους και συνεχής κίνησης για 30'

στους 37 °C. Μετά το πέρας των 30' προστέθηκαν 5 mL οξικού οξέως και ερμηνεύτηκαν τα αποτελέσματα σε συνθήκες φωτός.

2.3.5 Ανάλυση μεταβολισμού της δ.ο *Coumarhos*

Ακάρεια Βαρρόα τοποθετήθηκαν σε vials εμποτισμένα με [¹⁴C] *coumarhos* στους 25 °C για 20 ώρες, όπως αναλύθηκε πριν. Μετά το πέρας της περιόδου ξεπλύθηκαν με 200μL μεθανόλης και ομογενοποιήθηκαν σε 200μL μεθανόλης. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 5 min στις 5.000 rpm, συλλέχθηκε το υπερκείμενο διάλυμα ενώ το ίζημα που είχε δημιουργηθεί επαναδιαλύθηκε με methanol. Στη συνέχεια το υπερκείμενο διάλυμα συμπυκνώθηκε στα 10 μL με τη χρήση αέρα.

Για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των μεταβολιτών του *coumarhos*, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Χρωματογραφίας Λεπτής Στοιβάδας (Thin Layer Chromatography – TLC).

Οι πλάκες TLC ήταν μεγέθους 20*20 cm, από έλασμα αλουμινίου (aluminium sheet) με επίστρωση silica gel. Οι πλάκες είχαν την ικανότητα φθορισμού και προμηθεύτηκαν από την εταιρεία MERCK.

Σε κάθε πλάκα και σε ύψος 2 cm από τη βάση της, τοποθετούνταν τα δείγματα προς ανάλυση με απόσταση μεταξύ αυτών τουλάχιστον 2 cm. Όγκος δείγματος 10μl τοποθετούνταν σε κάθε θέση προς ανάλυση, καθώς και τα πρότυπα διαλύματα του *coumarhos* και των μεταβολιτών του (*Coroxon*, *Chlorferon*). Κάθε ένα από τα πρότυπα διαλύματα βρίσκονταν σε vials υπό διάλυση με διαλύτη μεθανόλης και σε συγκεντρώσεις ανιχνεύσιμες από το όργανο της Ραδιομετρικής μεθόδου (Radiometric Dating). Τα vials ήταν σκοτεινού χρώματος ενώ όλοι οι πρότυποι μεταβολίτες βρίσκονταν σε αναλυτική κατάσταση καθαρότητας (analytical grade) και προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Sigma Aldrich.

Οι πλάκες TLC, μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων επί αυτής, τοποθετούνταν σε δεξαμενή (tank) με μείγμα διαλυτών chloroform/methanol (100:7). Η στάθμη του μείγματος διαλυτών στη δεξαμενή ήταν επίπεδο χαμηλότερο από την ευθεία τοποθέτησης των δειγμάτων επί της πλάκας, ενώ ο διαχωρισμών της δ.ο και των μεταβολιτών της πραγματοποιούνταν καθώς το μείγμα διαλυτών προσροφώνταν από το υλικό επίστρωσης της πλάκας, διατρέχοντάς την καθ' ύψος.

Η ανίχνευση της δ.ο και των μεταβολιτών της έγινε με όργανο απεικόνισης της ραδιενέργειας που εκπέμπει ο [^{14}C] (Phosphorimager – GE Healthcare TyphoonTM FLA 7000). Στη συνέχεια υπολογίστηκε ο συντελεστής συγκράτησης (R_f) που αποτελεί τον λόγο της απόστασης που διένυσε η εκάστοτε ουσία προς την απόσταση που διένυσε ο διαλύτης επί της πλάκας. Για την επεξεργασία των εικόνων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα CorelDRAW Home & Student x7.

Η οπτική ανίχνευση της δ.ο *coumaphos* και των μεταβολιτών αυτής, επί των πλακών TLC πραγματοποιήθηκε με τη χρήση φορητής λάμπας υπεριώδους ακτινοβολίας (UV lamp), υπό την επίδραση της οποίας οι δ.ο παράγουν γαλάζιο φθορισμό.

2.3.5.1 Ποσοστό εισχώρησης [^{14}C] Coumaphos

Η πρόσληψη του [^{14}C] Coumaphos (μέσω εισχώρησης) από τα Βαρρόα αναλύθηκε συγκρίνοντας το εντομοκτόνο που είχε εισέλθει εντός των βαρρόα από τους πληθυσμούς AN-CR,ATH-S και υπολογίστηκε σύμφωνα με Balabanidou et al (2016) με μερικές τροποποιήσεις. Τα Βαρρόα εκτέθηκαν σε εμποτισμένα με υποθανάτια δόση εντομοκτόνου LC₅ vials. Τα vials τοποθετήθηκαν εντός επωαστικού θαλάμου, σε συνθήκες σκότους, στους 25 °C για 20 ώρες και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έκπλυση του [^{14}C] Coumaphos που υπήρχε στην εξωτερική επιφάνεια των βαρρόα, με τη χρήση 0.2mL μεθανόλης για τρεις φορές. Το προϊόν της έκπλυσης συμπυκνώθηκε στα 20 μl και αφού προστέθηκαν 10 mL liquid Scintillation Counting Mixture (Ultima Gold; 6013326; PerkinElmer) και μετρήθηκε η ενεργότητα του [^{14}C] coumaphos με τη χρήση συστήματος phosphorimager (Typhoon FLA 7000). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σύνθλιψη των Βαρρόα σε 0.5mL μεθανόλης και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, ούτως ώστε να προσδιοριστεί η ποσότητα [^{14}C] coumaphos που είχε εισέλθει εντός των οργανισμών. Το ποσοστό εισχώρησης (PR) του [^{14}C] Coumaphos στους πληθυσμούς *Varroa* υπολογίζεται ως ο λόγος εσωτερικών μετρήσεων ανά λεπτό προς εξωτερικών μετρήσεων ανά λεπτό.

2.3.6 Αλληλούχιση RNA (RNA sequencing)

* Η εργασία αυτή έγινε με τη βοήθεια του μεταδιδάκτορα ερευνητή Κων.Μαυρίδη (IMBB-ITE), συγκεκριμένα στη βιοπληροφορική ανάλυση της τρανσκριπτομικής ανάλυσης.

Θηλυκά ακάρεια Βαρρόα τοποθετήθηκαν σε γυάλινα vials (12mL) εμποτισμένα με 0.5 mL ακετόνης έκαστο (δείγματα ATH-S και AN-CR) ή 0.5 mL συγκέντρωσης 200 ppm Coumaphos έκαστο (tAN-CR). Οι συνθήκες έκθεσης των Βαρρόα ήταν στους 25 °C για 20 ώρες. Ο εμποτισμός των vials πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο «2.3.3 Βιοδοκιμές». Μετά από 20 ώρες, συλλέχθηκαν τα ζωντανά ακάρεια και μεταφέρθηκαν σε Eppendorf tube (10-20 Βαρρόα/tube), ψύχθηκαν ταχέως με χρήση υγρού άζωτου και αποθηκεύτηκαν στους -80 °C μέχρι την εξαγωγή RNA (βλ.2.3.6.1 Ομογενοποίηση ενήλικων ατόμων *Varroa* και απομόνωση ολικού RNA). Οι βιβλιοθήκες Illumina κατασκευάστηκαν από δείγματα RNA με χρήση του TruSeq Stranded mRNA Library Preparation Kit with polyA selection (Illumina, USA) και αλληλουχήθηκαν σε Illumina HiSeq 2500 για να δημιουργηθούν διπλά ειδικά ζεύγη ανάγνωσης από 2 x 125 ζεύγη βάσεων (η κατασκευή των βιβλιοθηκών και η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε στο High-Throughput Genomics Core of the Huntsman Cancer Institute, University of Utah, Utah, USA). Όλα τα δεδομένα της RNA αλληλούχισης που αποκτήθηκαν κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης είναι διαθέσιμα στο Gene-Expression Omnibus (GEO) με αριθμό πρόσβασης GSE153472. Η ποιότητα των αναγνώσεων επικαιροποιήθηκε με το FASTQC version 0.11.4 (Andrews 2015) και απομακρύνθηκαν οι επιμολύνσεις από ιούς που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA) όπως περιγράφεται από Love et al. 2015 (Εικόνα 2.5). Η ανάλυση διαφορικής έκφρασης (differential expression-(DE)) πραγματοποιήθηκε με το voom (έκδοση 3.34.9) (Law et al. 2014) και ο αριθμός διαβάσματος ανά γονίδιο με το HTSeq 0.6.0. Η διαφορική έκφραση γονιδίων (DEGs, $\log_2FC > 1$ και τιμή σημαντικότητας (p -value) προσαρμοσμένη κατά Benjamini-Hochberg < 0.05) υπολογίστηκε με τις ακόλουθες συγκρίσεις: AN-CR vs ATH-S, tAN-CR vs ATH-S και tAN-CR vs AN-CR).

Τα δεδομένα της αλληλούχισης RNA των δειγμάτων ATH-S και AN-CR χρησιμοποιήθηκαν επίσης για την ανίχνευση πιθανών μεταλλαγών στην *Ace*, το γονίδιο που κωδικοποιεί το σημείο-στόχο του Coumaphos. Αρχικά, οι αλληλουχίες του *Varroa Ace* εντοπίστηκαν με ανίχνευση του πρωτεώματος του *Varroa* στο BLASTp (έκδοση Οκτωβρίου

2017) και χρησιμοποιώντας την *Tetranychus urticae* Ace ως οδηγό ((tetur19g00850, <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/bogas/overview/Tetur>).

2.3.6.1 Ομογενοποίηση ενήλικων ατόμων *Varroa* και απομόνωση ολικού RNA

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν ευαίσθητα και ανθεκτικά στελέχη του *V. destructor*. Από κάθε κατηγορία ομογενοποιήθηκαν N=20 άτομα ανά δείγμα σε διάλυμα λύσης. Απομονώθηκε ολικό RNA με εκχύλιση σε μίγμα υδατικού διαλύματος θειοκυανικής γουανιδίνης – φαινόλης – χλωροφορμίου. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την γρήγορη και ασφαλή απομόνωση του RNA, συνδυάζοντας την κλασική εκχύλιση φαινόλης – χλωροφορμίου με την ισχυρή δράση επί των πρωτεϊνών της θειοκυανικής γουανιδίνης. Τόσο η φαινόλη όσο και η θειοκυανική γουανιδίνη είναι αποδιατακτικοί παράγοντες, συμβάλλοντας στην αποδιάταξη και κατά συνέπεια στην αδρανοποίηση των ριβονουκλεασών. Πιο συγκεκριμένα ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

1. Προετοιμασία δειγμάτων. Ομογενοποίηση δειγμάτων (20 ενήλικων ατόμων) σε 1000 μl μίγματος θειοκυανικής γουανιδίνης – φαινόλης με κατάλληλο ομογενοποιητή.

2. Για την διάσπαση των νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων το δείγμα αφήνεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

3. Φυγοκέντρηση σε 10000×g, για 10 λεπτά σε 4°C ψυχόμενης φυγοκέντρου, για απομάκρυνση των αδιάλυτων συστατικών. Μεταφορά υπερκείμενου διαλύματος σε 1,5ml erpendorf tube.

4. Προσθήκη 200 μl χλωροφορμίου και ισχυρή ανάμειξη για 15 λεπτά. Στην συνέχεια το δείγμα αφήνεται σταθερό σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.

5. Φυγοκέντρηση στους 4°C στα 13000×g, για 15 λεπτά. Στο τέλος αυτού του σταδίου το μείγμα έχει διαχωριστεί σε τρεις φάσεις: σε μια υπερκείμενη άχρωμη υδατική φάση που περιέχει κυρίως RNA, μια ενδιάμεση φάση που περιέχει κυρίως DNA και την υποκείμενη κόκκινη οργανική φάση που περιέχει τις πρωτεΐνες.

6. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο erpendorf tube 1,5 ml και προστίθεται ίση ποσότητα ισοπροπανόλης για την κατακρήμνιση του RNA. Παραμονή του δείγματος για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στα 12000 ×g, για 10 λεπτά στους 4°C. Το RNA κατακρημνίζεται και σχηματίζεται υπόλευκο ίζημα στο κάτω μέρος του σωλήνα.

7. Αφαίρεση του υπερκείμενου διαλύματος και πλύσιμο με 200 μl αιθανόλης 75%. Παραμονή του ιζήματος στο διάλυμα αιθανόλης για 5 λεπτά. Φυγοκέντρηση στα 12000 ×g για 10 λεπτά στους 4°C.

8. Αφαίρεση αιθανόλης και παραμονή του ιζήματος σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να στεγνώσει προσεκτικά. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 20 μl DEPC dd H₂O (nuclease free).

9. Το παραχθέν RNA επεξεργάστηκε με TURBO DNase (Ambion) ακολουθώντας το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

2.3.6.2 Προσδιορισμός της ποσότητας, της καθαρότητας και της ποιότητας του απομονωμένου ολικού RNA

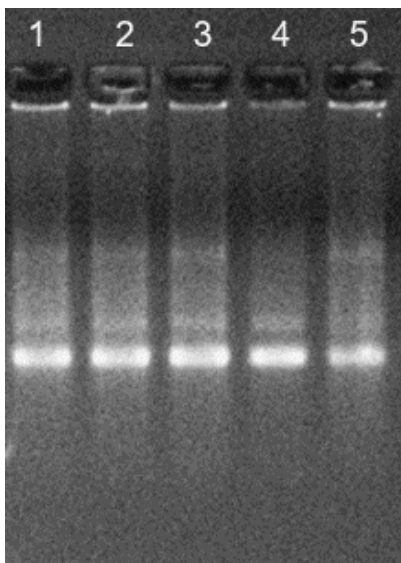
1. Προσδιορισμός της ποσότητας και της καθαρότητας του απομονωμένου ολικού RNA με φασματοφωτομετρία υπεριώδους.

Τα νουκλεϊκά οξέα παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης σε μήκος κύματος 254 nm που αποδίδεται στους αρωματικούς δακτυλίους της πυριμιδίνης και του ιμιδαζολίου, ενώ οι πρωτεΐνες απορροφούν σε μήκος κύματος 280 nm λόγω της παρουσίας του δακτυλίου των αρωματικών αμινοξέων. Για τον προσδιορισμό της ποσότητας και της καθαρότητας του RNA λαμβάνονται τιμές απορρόφησης και στα δύο προαναφερθέντα μήκη κύματος. Ο λόγος της απορρόφησης στα 260 nm προς την απορρόφηση στα 280 nm αποτελεί κριτήριο καθαρότητας του απομονωμένου RNA. Οι τιμές του προαναφερθέντος λόγου θα πρέπει να κυμαίνονται μεταξύ 1,6 – 1,9, καθώς μικρότερες τιμές υποδεικνύουν υψηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών ενώ μεγαλύτερες είναι ενδεικτικές παρουσίας DNA στο εκχύλισμα του RNA.

2. Προσδιορισμός της καθαρότητας απομονωμένου ολικού RNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Ο προσδιορισμός της ποιότητας του απομονωμένου RNA πραγματοποιείται με την ηλεκτροφόρησή του σε πήκτωμα αγαρόζης 1,0 % (w/v). Το πήκτωμα παρασκευάζεται χρησιμοποιώντας διάλυμα TBE 1× (89 mM Tris-HCl, pH = 8,3, 89 mM βορικό οξύ και 2,0 mM EDTA) και προσθέτοντας βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 1 μg/mL. Για την προετοιμασία των δειγμάτων RNA προς ηλεκτροφόρηση αναμιγνύεται όγκος διαλύματος RNA που περιέχει 1 μg RNA με DEPC-H₂O (Diethyl pyrocarbonate-treated H₂O) (Ambion Inc.) και διάλυμα φόρτωσης 2× (Fermentas International Ltd.), το οποίο περιέχει 95% (v/v) φορμαμίδιο, 0,025% (w/v) SDS, 0,025% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,025% (w/v) κυανό

του ξυλενίου, 0,025% (v/v) βρωμιούχο αιθίδιο, και 0,50 mM EDTA), σε τελικό όγκο φόρτωσης 6 μ L. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης που εφαρμόζονται στο πήκτωμα το οποίο έχει τοποθετηθεί σε διάλυμα TBE 0,5 \times είναι εφαρμογή σταθερής τάσης 50 V για 50 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα μεταφέρεται σε ειδική τράπεζα εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας όπου λαμβάνονται φωτογραφίες μέσω ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής. Το απομονωμένο RNA το οποίο είναι ακέραιο παρουσιάζει δύο ευδιάκριτες ζώνες που αντιστοιχούν στο ριβοσωμικό RNA (rRNA) (Εικόνα 2.1). Η μη επιτυχής απομόνωση του RNA μπορεί να διαπιστωθεί μέσω παρουσίας προϊόντων αποικοδόμησης κατά μήκος της διαδρομής ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 2.1. Ηλεκτροφόρηση ολικού RNA (1,0 μ g) από 5 αντιπροσωπευτικά δείγματα ιστού σε πήκτωμα αγαρόζης (1,0 % w/v).

2.3.7 Εντοπισμός γονιδίων P450s στο γονιδίωμα (gene annotation)

Οι προβλεπόμενες CYP αλληλουχίες του *V. destructor* από τη βάση δεδομένων NCBI επεξεργάστηκαν για την ακρίβεια τους και τη πληρότητα τους. Επτά από αυτές διορθώθηκαν και επιπρόσθετα μια πλήρης αλληλουχίας CYP βρέθηκε στη μεταγραφική μας ανάλυση και ενώ δεν είχε προβλεφθεί από το NCBI RefSeq models, υπήρχε στο γονιδίωμα ως intron-less γονίδιο. Συνολικά, βρέθηκαν στο κυτόχρωμα 26 πλήρους μεγέθους γονίδια, τα ονόματα των οποίων αποδόθηκαν επίσημα από τον Dr. D.R. Nelson (University of Tennessee). Όλα τα CYP γονίδια βρέθηκαν στην αρχική μεταγραφική ανάλυση. Έξι τμηματικές CYP αλληλουχίες και ψευδογονίδια που αποτελούν μη λειτουργικές αλληλουχίες DNA, αφαιρέθηκαν από την

περαιτέρω ανάλυση. Οι κυτοχρωμικές αλληλουχίες διαχωρίστηκαν σύμφωνα με MUSCLE (Edgar 2004), η φυλογένεση έγινε μέσω PhyML (www.phylogeny.fr) και το δέντρο σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>).

2.3.8 Μέθοδος λειτουργικής επικύρωσης της παρεμβολής RNA (RNAi – RNA interference)

Με τον όρο ανάστροφη γενετική εννοούμε την αδρανοποίηση ή αποσιώπηση ενός γονιδίου με παράλληλη διερεύνηση του φαινότυπου που προκύπτει. Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται με την τεχνική RNAi (RNA interference) που αποτελεί μηχανισμό ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης κατά τον οποίο το RNA καταστέλλει την έκφραση συμπληρωματικών προς αυτό γονιδίων. Στη συγκεκριμένη περίπτωση επετεύχθη μέσω της βύθισης ατόμων Βαρρόα σε dsRNA (double-stranded RNA) σύμφωνα με Campbell et al. 2010. Πραγματοποιήθηκε PCR σε cDNA από ανθεκτικά AN-CR ακάρεα χρησιμοποιώντας πολυμεράση Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, με ζεύγη ειδικών εκκινητών (primers). Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με το NCBI Primer BLAST ούτως ώστε να παραχθεί προϊόν μήκους 400-600 bp, με ποσοστό GC 20-50% που να εισάγει μια T7 αλληλουχία υποκινητή: dsGFP (μάρτυρας), dsCYP4EP4 και dsCYP3012A6 (Πίνακας 2.1). Τα τμήματα dsRNA σχεδιάστηκαν προσεκτικά με βάση το γονιδίωμα των κυτοχρωμικών γονιδίων (CYPome) του Βαρρόα με σκοπό να εξασφαλιστεί η μέγιστη ειδικότητα των γονιδίων στόχων, αλλά όχι μεταξύ άλλων μελών της 4ης ομάδας CYP. Το dsRNA δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας το Megascript Kit (Ambion) και η T7 RNA πολυμεράση με επώαση 16 ώρες στους 37°C, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο καθαρισμός του dsRNA έγινε με το MegaClear Transcription Clear Up kit (Ambion). Και το παραγόμενο προϊόν dsRNA αναλύθηκε με το σπεκτοφωτόμετρο Nanodrop (Nanodrop Technologies). Για τη μέθοδο της παρεμβολής RNAi, ομάδες 10 θηλυκών ακάρεων Βαρρόα βυθίστηκαν σε dsRNA (2.5 μg/ μl) για 6-12 ώρες. Για κάθε dsRNA πραγματοποιήθηκαν 8 επαναλήψεις. Ως μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε, GFP dsRNA που δεν είναι ενδογενές στο Βαρρόα, στην ίδια συγκέντρωση.

Πίνακας 2.1. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στη σύνθεση dsRNA. Το γονίδιο *GFP* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδια αναφοράς

Γονίδιο	Forward Εκκινητής (5' →3')	Reverse Εκκινητής (5' →3')	Μέγεθος προϊόντος PCR
Εκκινητές για τη σύνθεση dsRNA *			
dsGFP	<u>TAATACGACTCACTATA</u> GGGAGA <u>ACG</u> TAAACGGC CACAAGTTC	<u>TAATACGACTCACTATAG</u> GGAG <u>ACTT</u> GTACAGCTC GTCCATGCC	600 bp
dsCYP4EP4	<u>TAATACGACTCACTATA</u> GGGAGAGCCTTGGACTG CTAACAAGC	<u>TAATACGACTCACTATAG</u> GGAGACCTGCAAGTCTG CCTACTGT	417 bp
dsCYP3012A6	<u>TAATACGACTCACTATA</u> GGGAGAGTGGAATTGCC TTCGTCTGC	<u>TAATACGACTCACTATAG</u> GGAGATCGTATCTGCGCC TCCTAGT	441 bp

* Το μέρος των εκκινητών που είναι υπογραμμισμένο υποδηλώνει την T7 αλληλουχία υποκινητή για τη σύνθεση του dsRNA

2.3.9 Αντίδραση ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο (Real Time qPCR) για την σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *CYP4EP4* και *CYP3012A6* σε ανθεκτικούς και ευαίσθητους πληθυσμούς *Varroa*

Η τεχνική qPCR βασίζεται σε δύο βασικές διαδικασίες που συνδυάζονται ιδανικά: τον in vitro πολλαπλασιασμό μιας οριοθετημένης αλληλουχίας DNA μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και την παράλληλη και συνεχή ανίχνευση των προϊόντων που παράγονται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης μέσω επαναλαμβανόμενων μετρήσεων φθορισμού. Το μέρος του πολυμερισμού ακολουθεί τις ίδιες περίπου αρχές με τη συμβατική PCR. Ωστόσο, η qPCR βασίζεται στην ικανότητα των μορίων ανιχνευτών να προσδένονται, ειδικά ή μη ειδικά, στα προϊόντα της αντίδρασης με αποτέλεσμα την εκπομπή φθορισμού ο οποίος μπορεί να μετρηθεί αποτελεσματικά. Όταν η αντίδραση βρίσκεται στους πρώτους κύκλους πολυμερισμού ο φθορισμός που παράγεται είναι ιδιαίτερα μικρός με αποτέλεσμα να μην ξεχωρίζει από το σήμα υποβάθρου (background noise). Καθώς η αντίδραση φτάνει σε μεγαλύτερο αριθμό κύκλων το προϊόν DNA συσσωρεύεται εκθετικά (εκθετική φάση) και αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο

I. Σχεδιασμός των εκκινητών

Ο σχεδιασμός των εκκινητών-ανιχνευτών της αντίδρασης γίνεται ακολουθώντας τους γενικούς κανόνες που ακολουθούνται για τη συμβατική PCR λαμβάνοντας υπόψη επιπλέον τα παρακάτω:

i) Οι εκκινητές θα πρέπει να σχεδιάζονται με τέτοιο τρόπο ούτως ώστε να παρουσιάζουν Tm κοντά στους 60°C. Αυτό γίνεται γιατί στα περισσότερα πρωτόκολλα qPCR η υβριδοποίηση των εκκινητών και ο πολυμερισμός γίνεται σε ένα στάδιο, στους 60°C, καθώς αυτή είναι η βέλτιστη θερμοκρασία πολυμερισμού για την ειδική Taq πολυμεράση που χρησιμοποιείται στην αντίδραση.

ii) Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι η αντίδραση αποκτά τη μέγιστη απόδοσή της όταν ενισχύονται αλληλουχίες μικρού μεγέθους, το συνιστώμενο μέγεθος προϊόντων PCR είναι μεταξύ 60 και 300 bp.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι εκκινητές που σχεδιαστηκαν

Πίνακας 2.2. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην ποσοτική PCR. Τα γονίδια *18S rRNA* και *NADH* χρησιμοποιήθηκαν ως γονίδια αναφοράς για την κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *CYP4EP4* και *CYP3012A6*

Γονίδιο	Forward Εκκινητής (5' →3')	Reverse Εκκινητής (5' →3')	Μέγεθος προϊόντος PCR
Εκκινητές qPCR			
<i>18S rRNA</i>	AATGCCATCATTACCATCCT	CAAAAACCAATCGGCAATCT	60 bp
<i>NADH</i>	TCCGCTTAAGGAGCTTATCG	ATCACGCACAGCAGGTTATC	72 bp
<i>CYP4EP4</i>	CACGCACGGTCACAAAAGAG	CGGAAGAAAGCGGTCAGGAT	143 bp
<i>CYP3012A6</i>	CTTCAGCTTTGGGCCTCGTA	TCCGGTGTGTTGACGAGTTT	147 bp

2.3.9.1 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφή για τη σύνθεση μονόκλωνου συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Η ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων σε επίπεδο mRNA μέσω της τεχνικής qPCR απαιτεί την παραγωγή μορίων cDNA τα οποία θα χρησιμοποιηθούν ως αρχικό υπόστρωμα για

την αντίδραση qPCR. Η παραγωγή cDNA από το RNA επιτυγχάνεται με τη χρήση ενός ενζύμου που απομονώνεται, συνήθως, από ρετροϊούς και ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse Transcriptase). Πρόκειται για μια DNA πολυμεράση η οποία χρησιμοποιεί το RNA ως υπόστρωμα για να δημιουργήσει συμπληρωματικά μόρια DNA. Απαραίτητο στοιχείο για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση είναι η ύπαρξη ενός συμπληρωματικού μορίου εκκινητή το οποίο καθορίζει και την ειδικότητα της αντίδρασης. Ως εκκινητές στην αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκαν ολιγονουκλεοτίδια δεοξυθυμιδίνης (oligo-dT) τα οποία υβριδοποιούνται στην poly(A) ουρά των mRNAs με αποτέλεσμα την επιλεκτική μεταγραφή των mRNAs.

Η αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής του mRNA πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια:

1. Στο πρώτο στάδιο αναμιγνύεται όγκος ολικού RNA που αντιστοιχεί σε 1,0 µg με 0,5 µg μορίων oligo-dT αποτελούμενα από 18 θυμιδίνες, και DEPC-H₂O σε τελικό όγκο αντίδρασης 15,0 µL. Ακολουθεί επώαση στους 70°C για 5 min και γρήγορη μεταφορά των μιγμάτων στους 4°C, μετά το τέλος της επώασης. Στο πρώτο αυτό στάδιο επιτυγχάνεται η αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών του RNA και η πρόσδεση των μορίων εκκινητών oligo-dT.

2. Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται η αντίστροφη μεταγραφή καθαυτή καθώς προστίθενται στο μίγμα 200 U αντίστροφης μεταγραφάσης M-MuLV (Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase), 40 U αναστολέα RNAsών RNase Inhibitor (Finnzymes, Inc), το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης [(50 mM Tris-HCl, pH = 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol-DTT (τελικές συγκεντρώσεις)] καθώς και 0,5 mM (τελική συγκέντρωση) από κάθε dNTP. Συμπληρώνεται κατάλληλος όγκος DEPC-H₂O έως τα 20 µL του τελικού όγκου της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 1 h και η αντίδραση τερματίζεται με επώαση στους 70°C για 10 min.

II. Εύρεση βέλτιστων συνθηκών της αντίδρασης και έλεγχος ποιότητας

Για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών των αντιδράσεων qPCR για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *18S rRNA* και *NADH* (γονίδια αναφοράς) και των *CYP3012A6* και *CYP4EP4* (γονίδια στόχοι) δοκιμάστηκε ένα εύρος συγκεντρώσεων εκκινητών (50 – 400 nM).

Η βελτιστοποιημένη αντίδραση περιλαμβάνει σε κάθε περίπτωση 5,0 μL qPCR Master Mix Kara SYBR 2× (Kara Biosystems, Inc), τους εκάστοτε εκκινητές σε συγκέντρωση 300 nM, 1,0 ng cDNA και DEPC-H₂O μέχρι τελικού όγκου 10 μL.

Το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια: 95°C – 3 min ως αρχικό στάδιο αποδιάταξης και ενεργοποίησης της Taq πολυμεράσης και 40 κύκλους των: 95°C – 15 sec (στάδιο αποδιάταξης) και 60°C – 1 min (στάδιο υβριδοποίησης των εκκινητών, επιμήκυνσης και καταγραφής του εκπεμπόμενου φθορισμού).

Μετά από κάθε αντίδραση qPCR ακολουθεί η ανάλυση ειδικότητας των προϊόντων μέσω παραγωγής καμπυλών τήξης με βάση το παρακάτω θερμοκρασιακό πρωτόκολλο: σταδιακή ανύψωση θερμοκρασίας από 59°C έως 95°C με ρυθμό 0.1°C/sec και παράλληλη μέτρηση του εκπεμπόμενου φθορισμού για κάθε 0.3 °C ανύψωσης. Μέσω της καμπύλης τήξης, υπολογίζεται το T_m των εκάστοτε προϊόντων που παράγονται κατά την αντίδραση. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ των ειδικών προϊόντων και των μη ειδικών προϊόντων ή/και των διμερών των εκκινητών που πιθανώς σχηματίζονται κατά την αντίδραση. Για όλα τα γονίδια που αναλύθηκαν παρατηρήθηκε μια μοναδική κορυφή στην ανάλυση καμπύλης τήξης, γεγονός που πιστοποιεί την ειδικότητα των αντιδράσεων.

Ως μέρος του ποιοτικού ελέγχου πραγματοποιήθηκε πείραμα πρότυπων καμπυλών (για τον υπολογισμό της απόδοσης της κάθε αντίδρασης).

III. Βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο qPCR και αποτελέσματα

1. Προετοιμασία των αντιδράσεων με βάση το παρακάτω πρωτόκολλο για τα δύο γονίδια αναφοράς *r18S* και *NADH* και τα γονίδια στόχοι *CYP3012A6*, *CYP4EP4* για τα δείγματα μάρτυρες (ευαίσθητος πληθυσμός x 3 βιολογικά αντίγραφα x 2 τεχνικά αντίγραφα) και τα δείγματα ελέγχου (ανθεκτικός πληθυσμός x 3 βιολογικά αντίγραφα x 2 τεχνικά αντίγραφα): 5,0 μL qPCR Master Mix Kara SYBR 2× (Kara Biosystems, Inc), τους εκάστοτε εκκινητές σε συγκέντρωση 300 nM, 1,0 ng cDNA και DEPC-H₂O μέχρι τελικού όγκου 10 μL.

2. Εκτέλεση της αντίδρασης και της καμπύλης τήξης με το παρακάτω θερμικά πρωτόκολλα:

Θερμικό πρωτόκολλο αντίδρασης: 95°C – 3 min, και 40 κύκλους των: 95°C – 15 sec και 60°C – 1 min.

Θερμικό πρωτόκολλο καμπύλης τήξης: Σταδιακή ανύψωση θερμοκρασίας από 59°C έως 95°C με ρυθμό 0.1°C/sec και παράλληλη μέτρηση του εκπεμπόμενου φθορισμού για κάθε 0.3 °C ανύψωσης.

3. Ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη προσέγγιση της σχετικής ποσοτικοποίησης μέσω της μέθοδο σύγκρισης των Ct (Comparative Ct method) και της μεθόδου του Pfaffl (Michael W. Pfaffl A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR *Nucleic Acids Res.* 2001 May 1; 29(9): e45) και του λογισμικού REST (v.2019).

Η εφαρμογή του παραπάνω πρωτοκόλλου οδήγησε στον υπολογισμό της υποέκφρασης του γονιδίου *CYP4EP4* στα ανθεκτικά δείγματα *Varroa* σε σχέση με τα ευαίσθητα (> 2 φορές υποέκφραση, $P < 0.05$). Αυτό φαίνεται και από τη σταθερή έκφραση των γονιδίων αναφοράς (παρόμοιες τιμές Ct) στις δύο κατηγορίες δειγμάτων και την ίδια στιγμή τη χαμηλότερη έκφραση του γονιδίου *CYP4EP4* στα ανθεκτικά δείγματα (υψηλότερες τιμές Ct) σε σχέση με τα ευαίσθητα.

2.4 Αποτελέσματα

2.4.1 Χαρακτηρισμός της ανθεκτικότητας στη δ.ο Coumaphos, πληθυσμού Βαρρόα από το νησί της Άνδρου

Τα επίπεδα ανθεκτικότητας των πληθυσμών Βαρρόα εξετάστηκαν με κλασικές μεθόδους βιοδοκιμών όπως περιγράφεται στο 2.3.4 Βιοδοκιμές βιολογικού υλικού (Πίνακας 2.3). Μετά την έκθεση του ευαίσθητου πληθυσμού ATH-S στη δ.ο Coumaphos, καθορίστηκε η καμπύλη δόσης-απόκρισης και ορίστηκε ως διαγνωστική δόση τα 200 mg/L η οποία προκαλεί 95% θνησιμότητα στον ATH-S πληθυσμό. Ο πληθυσμός AN-CR παρουσίασε σημαντικά μειωμένη θνησιμότητα (7%) σε σύγκριση με τους πληθυσμούς που εξετάστηκαν, μετά την έκθεση τους στη διαγνωστική δόση

Πίνακας 2.3. Ποσοστιαία θνησιμότητα πληθυσμών *Varroa* μετά την έκθεση τους στη διαγνωστική δόση coumaphos (200ppm)

Πληθυσμοί	Ημερομηνία	n*	Θνησιμότητα (%)	Ιστορικό επεμβάσεων (5y)	Συντεταγμένες GPS (N,E)
Athens (AUA-S)	7/2017	80	93±4	-	(37.982475, 23.705533)
Andros (AN-CR)	9/2017	60	7±3	C (10x)	(37.861864, 24.790071)
Sparti	7/2018	60	88±3	A (6x),F(4x)	(36.846375, 23.001934)
Naxos	9/2017	60	62±3	C (5x),F(3x),A(2x)	(37.099604, 25.482232)
Crete	9/2018	60	90±4	A (5x),F(4x),C(1x)	(35.284983, 25.062404)
Thessaloniki	7/2019	60	82±3	A (5x),C(2x),O(3x)	(40.579336, 23.046397)

n: αριθμός ακάρεων που εξετάστηκαν (σε ομάδες των 10);
 Διαγνωστική δόση εκφρασμένη σε ppm (σε 500ul ανά vial);
 C: coumaphos; A: Amitraz; F: tau-Fluvalinate

Πραγματοποιήθηκαν πλήρης βιοδοκιμές δόσης απόκρισης για τον ευαίσθητο (ATH-S) και τον ανθεκτικό πληθυσμό (AN-CR) προκειμένου να διερευνηθεί η δυναμική του φαινότυπου. Σύμφωνα με τον πίνακα 2.4, ο συντελεστής ανθεκτικότητας (RR) ανέρχεται σε 217-fold του ανθεκτικού πληθυσμού σε σύγκριση με τον ευαίσθητο στο coumaphos πληθυσμό.

Πίνακας 2.4. Αποτελέσματα θνησιμότητας ακάρεων *Varroa destructor* μέσω βιοδοκιμών στο coumaphos και coroxon (coumaphos oxon).

Θεραπεία	n*	LC ₅₀ †	Slope ± SE	χ ² ‡	Df	RR ₅₀ § (95% CI)
ATH-S						
Coumaphos	276	14.35 (4.25-35.54)	0.86±0.09	7.09	3	-
Coroxon	195	0.021 (0.005-0.070)	0.91±0.12	5.08	3	-
AN-CR						
Coumaphos	152	3112.2 (1291.4-10832.5)	1.7±0.26	6.16	3	217 (117.61-399.79)
Coroxon	160	0.51 (0.02-1.001)	0.73±0.12	1.16	2	25 (8.68-71.00)

*αριθμός ακάρεων που εξετάστηκαν

†LC, θανατηφόρα συγκέντρωση εκφρασμένη σε mg/l

‡Chi-square testing linearity

§RR, συντελεστής ανθεκτικότητας: LC (coumaphos) /LC_{ATH-S} (coumaphos) ; LC (coroxon) /LC_{ATH-S} (coroxon)

CI, διάστημα εμπιστοσύνης

2.4.2 Η ανθεκτικότητα δεν οφείλεται σε μειωμένη είσοδο του Coumaphos στα ανθεκτικά Βαρρόα

Η ποσότητα εισερχόμενου [¹⁴C] coumaphos ορίστηκε ως το αποτέλεσμα της μέτρησης του [¹⁴C] coumaphos που μετρήθηκε στο εσωτερικού του οργανισμού προς το αποτέλεσμα της μέτρησης [¹⁴C] coumaphos που λήφθηκε από την επιφάνεια των ακάρεων (internal cpm/total cpm).

Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά της ποσότητας εισερχόμενου [¹⁴C] coumarhos μεταξύ των ανθεκτικών και των ευαίσθητων ακάρεων, ως εκ τούτου δεν υπάρχει μειωμένη εισχώρηση που να σχετίζεται με την ανθεκτικότητα (Πίνακας 2.5).

Πίνακας 2.5. Λόγος εισχώρησης [¹⁴C] Coumarhos σε coumarhos ανθεκτικά (AN-CR) και ευαίσθητα (ATH-S) ακάρεα *Varroa*.

Στέλεχος	PR(10 ⁻²), (±SD)
ATH-S	9.85 (±0.39)
AN-CR	10.35 (±0.45)

n=3 επαναλήψεις.

PR. Penetration Rate: Λόγος εσωτερικών μετρήσεων ανά λεπτό προς εξωτερικών μετρήσεων ανά λεπτό; SD. Τυπική απόκλιση (Standard Deviation)

2.4.3 Η ανθεκτικότητα δεν σχετίζεται με αυξημένη αποτοξικοποίηση στα ανθεκτικά Βαρρόα

2.4.3.1 Ανάλυση ενζύμων αποτοξικοποίησης

Η ανάλυση των ενζύμων αποτοξικοποίησης για τα ευαίσθητα και τα ανθεκτικά Βαρρόα έγινε σύμφωνα με «2.3.5.3 Μέτρηση ενεργότητας ενζυμικών συστημάτων». Τα αποτελέσματα της παραπάνω ανάλυσης παρουσιάζονται στον πίνακα 2.6. Πιο συγκεκριμένα, η ενεργότητα των εστερασών στα υποστρώματα p-nitrophenol (PNPA), 1-naphthyl acetate (1-NA) και 1-naphthyl acetate (2-NA); η ενεργότητα των GSTs στο υπόστρωμα CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene); και ενεργότητα των P450s οξειδασών στο ενζυμικό υπόστρωμα 7-Ethoxycoumarin (7-EC) δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των AN-CR και ATH-S ακάρεων. Εν αντιθέση, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της ενεργότητας των GSTs στο υπόστρωμα Monochlorobimane (MCB).

Πίνακας 2.6. Ενεργότητα ενζύμων αποτοξικοποίησης στους πληθυσμούς ATH-S and AN-CR

Πληθυσμός	CCEs			MO	GST	
	PNPA	1-NA	2-NA	7-EC	CDNB	MCB
ATH-S	16.43±1.9	17.66±1.1	24.31±1.7	8.53±3.3	0.013±0.002	537.18±54.9
AN-CR	15.84±1.7	18,81±0.6	23.55±1.5	10.46±4.7	0.019±0.002	74.14±8.32*

Varroa destructor

Συνομογραφίες και μονάδες: CCEs (carboxyl/choline εστεράσες): PNPA nmole/min/mg, 1-NA/2-NA: nmole a or b- naphthol/min/mg; MO (μονοοξυγενάσες): pmole 7OH/min/mg; GSTs (τρανσφεράση της γλουταθειόνης): CDNB: μmol CDNB conjugated/min/mgg, MCB: RFU/μg; Οι μονάδες είναι εκφρασμένες σε M.O ± SE. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο σύγκρισης ανεξάρτητων δειγμάτων t-test. *Στατιστικά σημαντική διαφορά (P < 0.05).

Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ενεργότητα της ακετυλοχολινεστεράσης ή στην ενζυμική παρεμπόδιση της ακετυλοχολινεστεράσης από τα οργανοφωσφορικά ανάλογα (Coroxon, malaoxon) μεταξύ των πληθυσμών ATH-S and AN-CR όπως φαίνεται και στον πίνακα 2.7.

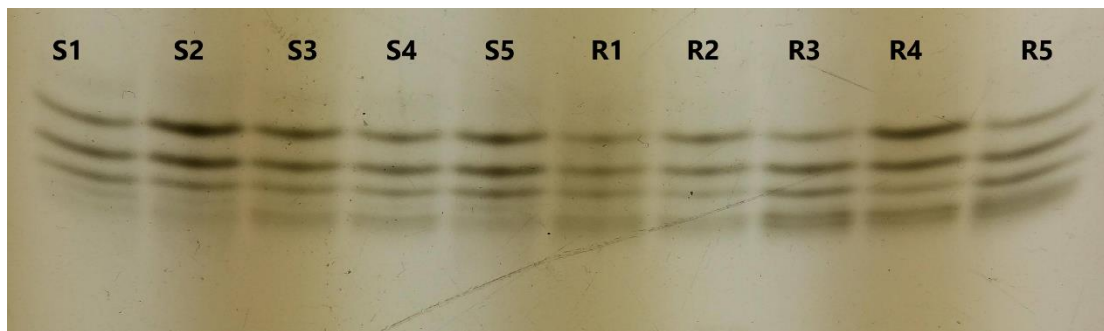
Πίνακας 2.7. Ενεργότητα της ακετυλοχολινεστεράσης σε οργανοφωσφορικά ανάλογα στους πληθυσμούς ATH-S and AN-CR *Varroa destructor*

Πληθυσμός	AChE		
	Ενεργότητα	IC ₅₀	
		Malaoxon	Coroxon
ATH-S	75.01± 5.35	2.37±0.12 x 10 ⁻⁵	6.90±0.5 x 10 ⁻⁷
AN-CR	73.89± 4.72	3.23±0.16 x 10 ⁻⁵	8.08±0.7 x 10 ⁻⁷

Συνομογραφίες και μονάδες: AChE (Ακετυλοχολινεστεράση): nmol/min/mg protein ; IC₅₀: µg/ml. Οι μονάδες είναι εκφρασμένες σε M.O ± SE. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο. *Στατιστικά σημαντική διαφορά (P < 0.05).

2.4.3.2 Προφίλ εστερασών μεταξύ ευαίσθητων και ανθεκτικών Βαρρόα

Πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των εστερασών με βάση το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου με ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης (IsoElectric Focusing – IEF) pH 3-10 σύμφωνα με 2.3.5.4 Διαχωρισμός εστερασών με βάση το ισοηλεκτρικό σημείο (pI). Παρατηρήθηκαν αρκετές μπάντες εστερασών στον ευαίσθητο και στον ανθεκτικό πληθυσμό, όλες εντός του εύρους ισοηλεκτρικού σημείου (pI) 6.0 και 4.5, όμως δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των δυο πληθυσμών (Εικόνα 2.2). Ως εκ τούτου, οι καρβοξυλ/ χολινό εστεράσες δεν εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα.

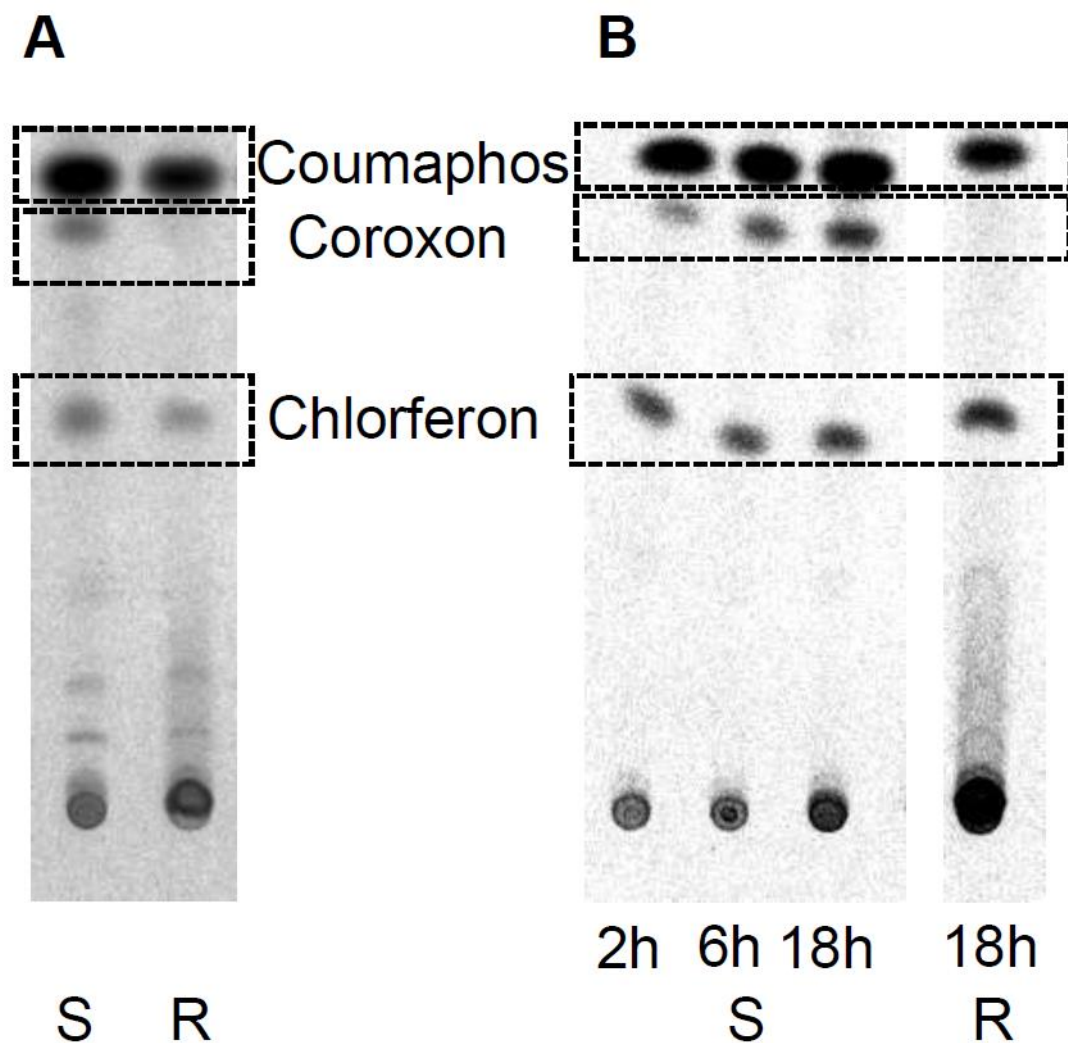


Εικόνα 2.2. Διαχωρισμός των εστερασών με βάση το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) των πρωτεϊνών ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης (IEF).

2.4.4 Η μειωμένη ενεργοποίηση του Coumarphos σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στα ανθεκτικά Βαρρόα

Η ανάλυση των εκχυλισμάτων μετά από έκθεση σε [^{14}C] coumarphos από τα ευαίσθητα (ATH-S) και τα ανθεκτικά (AN-CR) Βαρρόα έγινε σύμφωνα με «2.3.5 Ανάλυση μεταβολισμού της δ.ο *Coumarphos*». Το αποτέλεσμα ήταν η παρουσία του coumarphos [με συντελεστή συγκράτησης ($R_f = 0.83$)], δύο κύριων γνωστών μεταβολιτών και μερικών άγνωστων δευτερευόντων μεταβολιτών. Οι κύριοι μεταβολίτες ήταν, ο ενεργοποιημένος μεταβολίτης Coroxon ($R_f = 0.75$) και ο μη τοξικός μεταβολίτης chlorferon ($R_f = 0.50$). Παράλληλα, βρέθηκαν μερικές πολικές ενώσεις με $R_f = 0.25$ ή και χαμηλότερο (εικόνα 2.3). Ο σχηματισμός του μη τοξικού μεταβολίτη chlorferon μέσω αποτοξικοποίησης του coumarphos από τον οργανισμό, ήταν παρόμοιος μεταξύ των AN-CR και ATH-S πληθυσμών, όπως και ο σχηματισμός των αγνώστων μεταβολιτών. Παρόλα αυτά, παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στον σχηματισμό του Coroxon, την ενεργοποιημένη τοξική μορφή του οργανοφωσφορικού ακαρεοκτόνου. Το Coroxon σχηματίστηκε και εμφανίστηκε στον ATH-S πληθυσμό, ενώ υπήρξε και χρονική εξάρτηση της παραγωγή του. Αντιθέτως, μετά βίας ανιχνεύτηκε στον ανθεκτικό AN-CR πληθυσμό, 18h μετά την έκθεση του σε 200 ppm [^{14}C] coumarphos.

Για να επιβεβαιώσουμε το γεγονός ότι η μειωμένη ενεργοποίηση του προεντομοκτόνου είναι υπεύθυνη για την ανθεκτικότητα, πραγματοποιήσαμε βιοδοκιμές με Coroxon, ούτως ώστε να παρακάμψουμε το στάδιο της ενεργοποίησης εντός του Βαρρόα. Οι βιοδοκιμές έδειξαν ότι ο ανθεκτικός φαινότυπος μειώθηκε δραματικά καθώς ο συντελεστής ανθεκτικότητας (RR) μειώθηκε από 217 φορές για το coumarphos, σε 25 φορές για το Coroxon (Πίνακας 2.4).

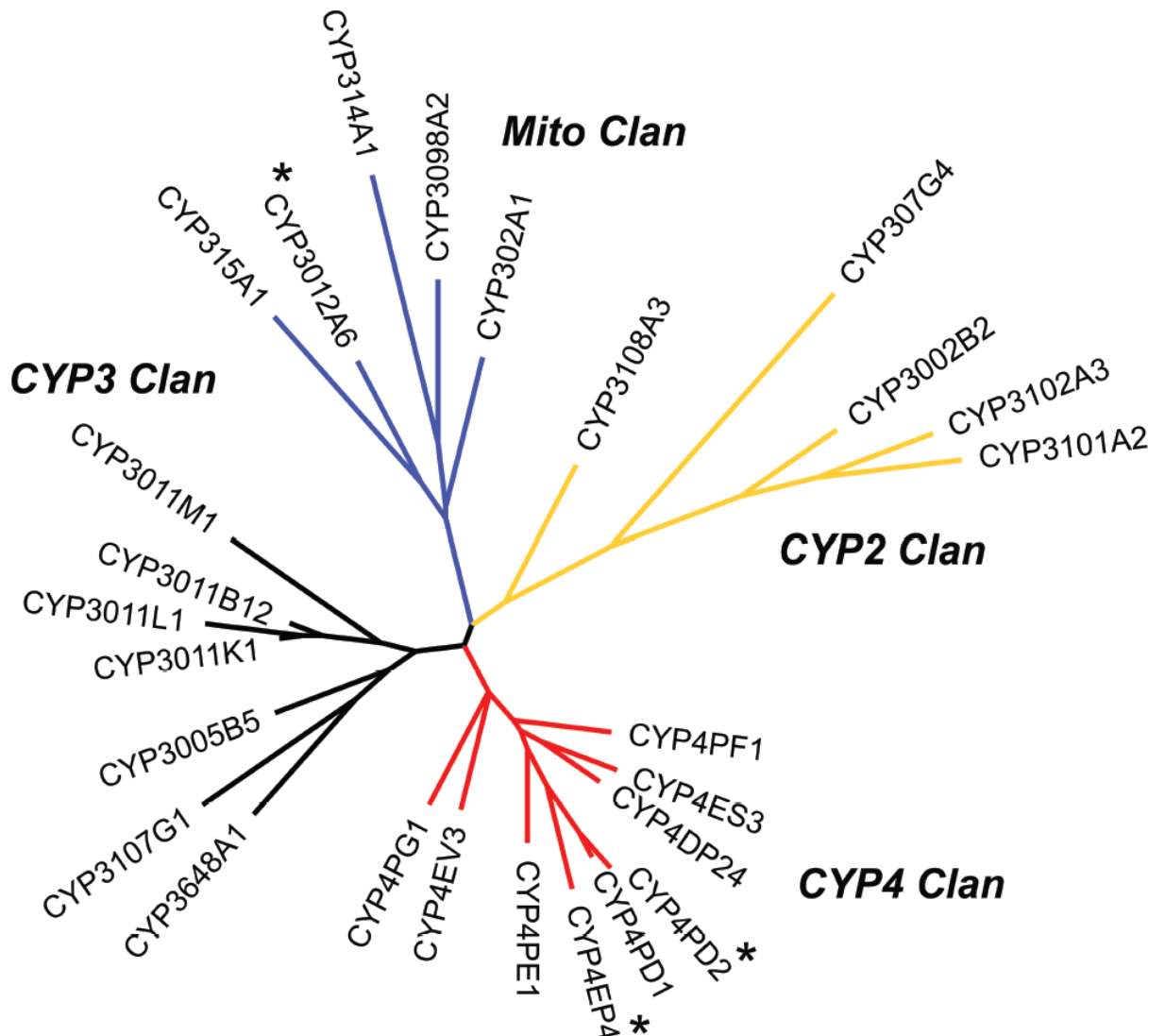


Εικόνα 2.3. Ανάλυση μεταβολιτών με χρωματογραφία λεπτής σιβάδας, μετά από *in vivo* έκθεση των Βαρρόα σε [^{14}C] coumaphos. Α. Η μειωμένη ενεργοποίηση του coumaphos σε Coroxon σχετίζεται με την ανθεκτικότητα. Β. Χρονική εξάρτηση της παραγωγής Coroxon σε ΑΤΗ-S Βαρρόα (2h, 6h και 18h μετά από *in vivo* έκθεση) αλλά όχι σε ΑΝ-CR Βαρρόα (18h μετά από *in vivo* έκθεση).

2.4.5 Κυτοχρωμικές P450s του *Varroa destructor*

Το γονιδίωμα των κυτοχρωμικών γονιδίων (CYPome) του *V.destructor* αποτελείται από 26 πλήρους μεγέθους αλληλουχίες. Αυτό είναι ένα από τα μικρότερα (CYPome) που έχουν εντοπιστεί στα αρθρόποδα. Είναι αρκετά μικρότερο από το 63 CYPs από το αρπακτικό άκαρι *Metaseiulus occidentalis* και μόλις το μισό μέγεθος από το CYPome της μέλισσας (Dermauw et al. 2020). Οι 26 CYPs του Βαρρόα σχηματίζουν 4 CYP ομάδες (εικόνα 2.4), όπως στον τετράνυχχο και σε άλλα έντομα. Η CYP307G4 της CYP2 ομάδας και οι CYP302A1, CYP314A1,

CYP315A1 της μιτοχονδριακής CYP ομάδας εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της εκδυσόνης και είναι αρκετά συντηρημένες.



Εικόνα 2.4: Το γονιδίωμα των κυτοχρωμικών γονιδίων (CYPome) του *V.destructor* και η ταξινόμηση τους σε τέσσερις CYP ομάδες.

2.4.6 Οι κυτοχρωμικές P450 μονοοξυγενάσες CYP4EP4, CYP3012A6 σχετίζονται με την μειωμένη ενεργοποίηση του Coumarhos στα ανθεκτικά Βαρρόα.

Για να διερευνήσουμε τη μεταγραφική βάση της ανθεκτικότητας του Βαρρόα στο Coumarhos, πραγματοποιήσαμε αλληλούχιση RNA στους πληθυσμούς ATH-S, AN-CR και AN-CR που είχε πρώτα εκτεθεί στο Coumarhos (tAN-CR). Μετά από φιλτράρισμα των δεδομένων αλληλούχισης RNA για τη παρουσία ιικών αλληλουχιών, πραγματοποιήθηκε ανάλυση διαφορικής έκφρασης γονιδίων μεταξύ των πληθυσμών AN-CR με ATH-S και μεταξύ των tAN-

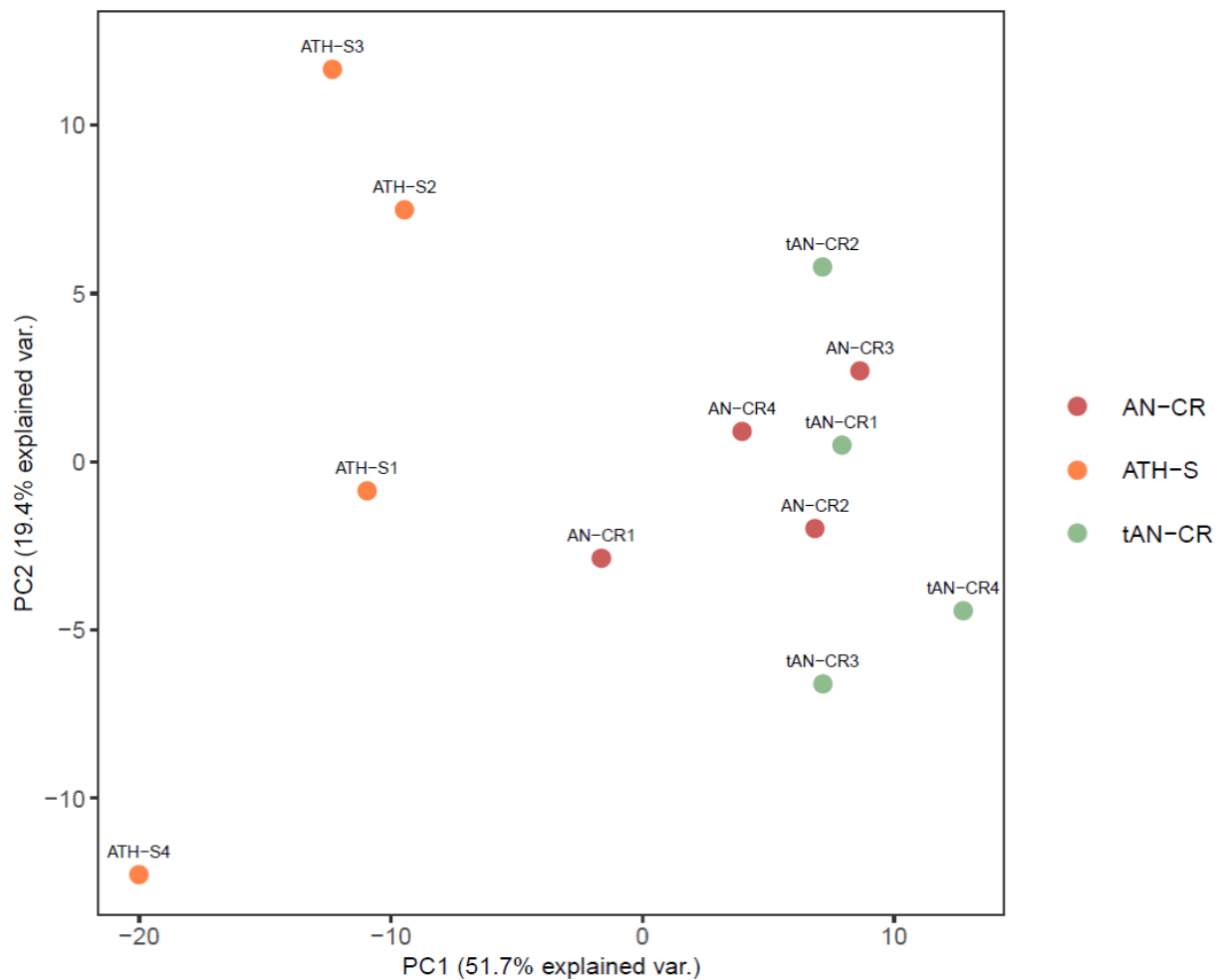
CR με AN-CR. Συνολικά, ανιχνεύθηκαν 270 διαφορεικά εκφρασμένα γονίδια (DEGs) στον AN-CR σε σύγκριση με τον ATH-S (επίπεδο διαφορικής έκφρασης [FC]>2 και επίπεδο σημαντικότητας κατά Benhamini-Hochberg P value < 0.05). Μεταξύ αυτών μόνο 12 ένζυμα αποτοξικοποίησης (P450s[InterPro domain IPR001128], CCEs [IPR002018], GSTs [IPR036282]) ή πρωτεΐνες (ABC μεταφορείς [IPR003439]) εμπλέκονται στην απομάκρυνση των ξενοβιοτικών ουσιών. Τρία γονίδια κωδικοποιούν CYPs. Τα δύο εξ αυτών ήταν υποεκφρασμένα (*CYP4EP4*, *CYP3012A6*), ενώ ένα ήταν υπερεκφρασμένο (*CYP4DP2*) στα ανθεκτικά ακάρεα (AN-CR) σε σύγκριση με τα ευαίσθητα (ATH-S).

Η ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA) (εικόνα 2.5) δείχνει πως η διαφορική έκφραση γονιδίων μεταξύ tAN-CR και AN-CR ακάρεων παρουσιάζει υψηλή ομοιότητα και πως υπάρχει πολύ μικρή αλλαγή στην έκφραση γονιδίων μετά από έκθεση των ανθεκτικών Βαρρόα στο Coumaphos. Επιπλέον, επεξεργαστήκαμε τα δεδομένα της RNA αλληλούχισης των πληθυσμών ATH-S και AN-CR για να εξετάσουμε τη παρουσία μεταλλαγών στα γονίδια του *V. Destructor Ace*. Τα γονίδια που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη δεν εμφάνισαν νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς, ως εκ τούτου η ακετυλοχολινεστεράση που αποτελεί τον σημείο στόχο του Coumaphos, δεν είναι υπεύθυνη για την ανθεκτικότητα των *Varroa* στο Coumaphos. Η θεωρία αυτή ενισχύεται από τα βιοχημικά δεδομένα μας (πίνακας 2.7).

Πίνακας 2.8. Διαφορική έκφραση μεταγράφων μεταξύ ανθεκτικών στο coumaphos (AN-CR) και ευαίσθητων *V. destructor* (ATH-S), που κωδικοποιούν γονίδια αποτοξικοποίησης / μεταφορείς (P450, CCE, GST and ABC).

Οικογένεια ενζύμων	Γονίδιο	log ₂ FC RNAseq
P450	<i>CYP4EP4</i> (IPR036396)	-1.84
P450	<i>CYP3012A6</i> (IPR036396)	-1.62
P450	<i>CYP4DP2</i> (IPR036396)	1.64
CCE	- (IPR002018)	-1.22
CCE	- (IPR002018)	-1.34

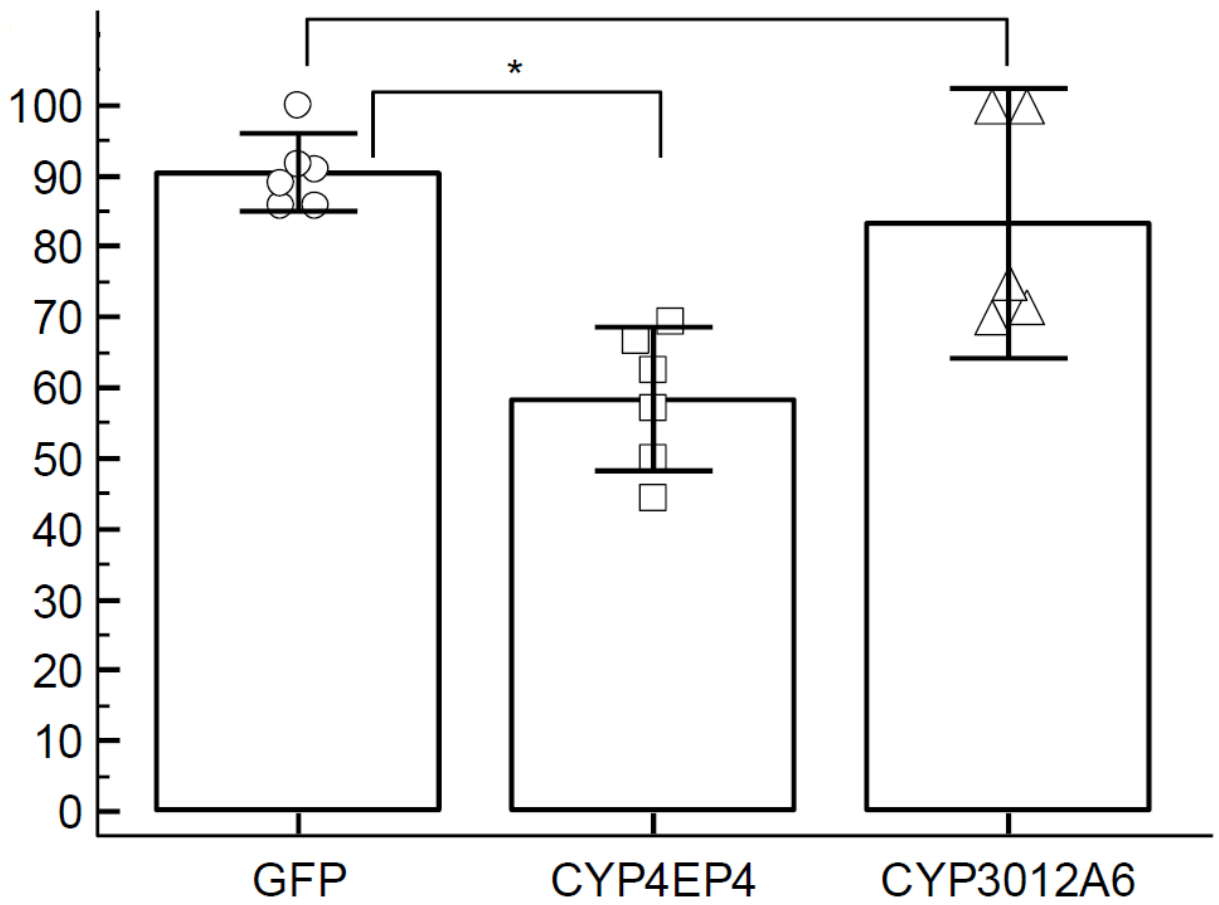
CCE	- (IPR002018)	-1.05
CCE	- (IPR002018)	-1.23
CCE	- (IPR002018)	-2.06
GST	- (IPR040079)	-1.00
GST	- (IPR040079)	-1.10
ABCC	- (IPR003439)	-1.22
ABCA	- (IPR003439,IPR026082)	-1.37



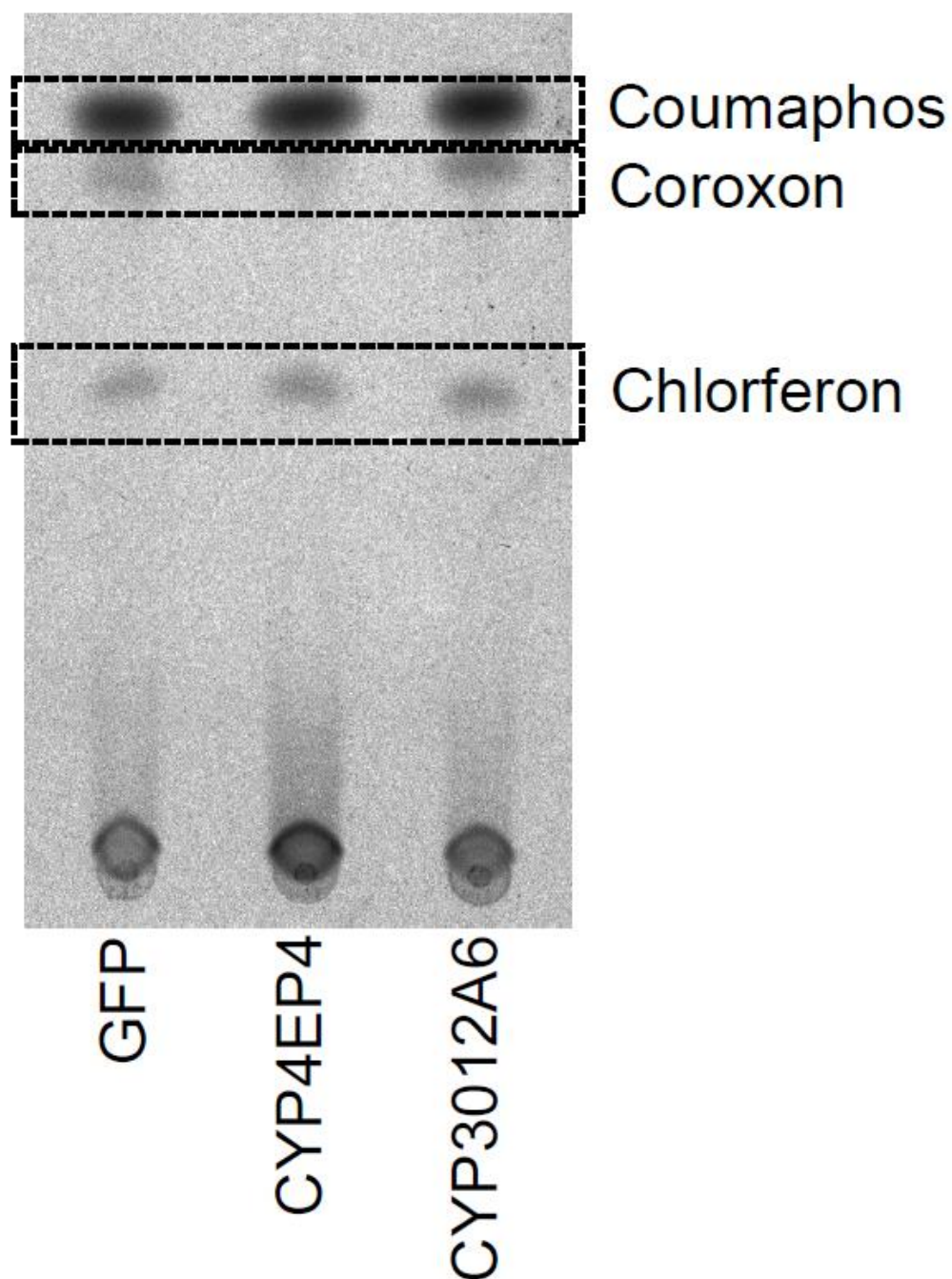
Εικόνα 2.5: Ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA): Οι σχέσεις γονιδιακής έκφρασης μεταξύ δειγμάτων *V.destructor*; ευαίσθητα ακάρεα (ATH-S), ακάρεα ανθεκτικά στο Coumaphos (AN-CR) και ακάρεα ανθεκτικά που έχουν εκτεθεί στο Coumaphos (tAN-CR)

2.4.7 Η σίγηση της *CYP4EP4* του *Varroa destructor* αποτρέπει την ενεργοποίηση του Coumaphos και αυξάνει την αντοχή στα ευαίσθητα *Varroa*.

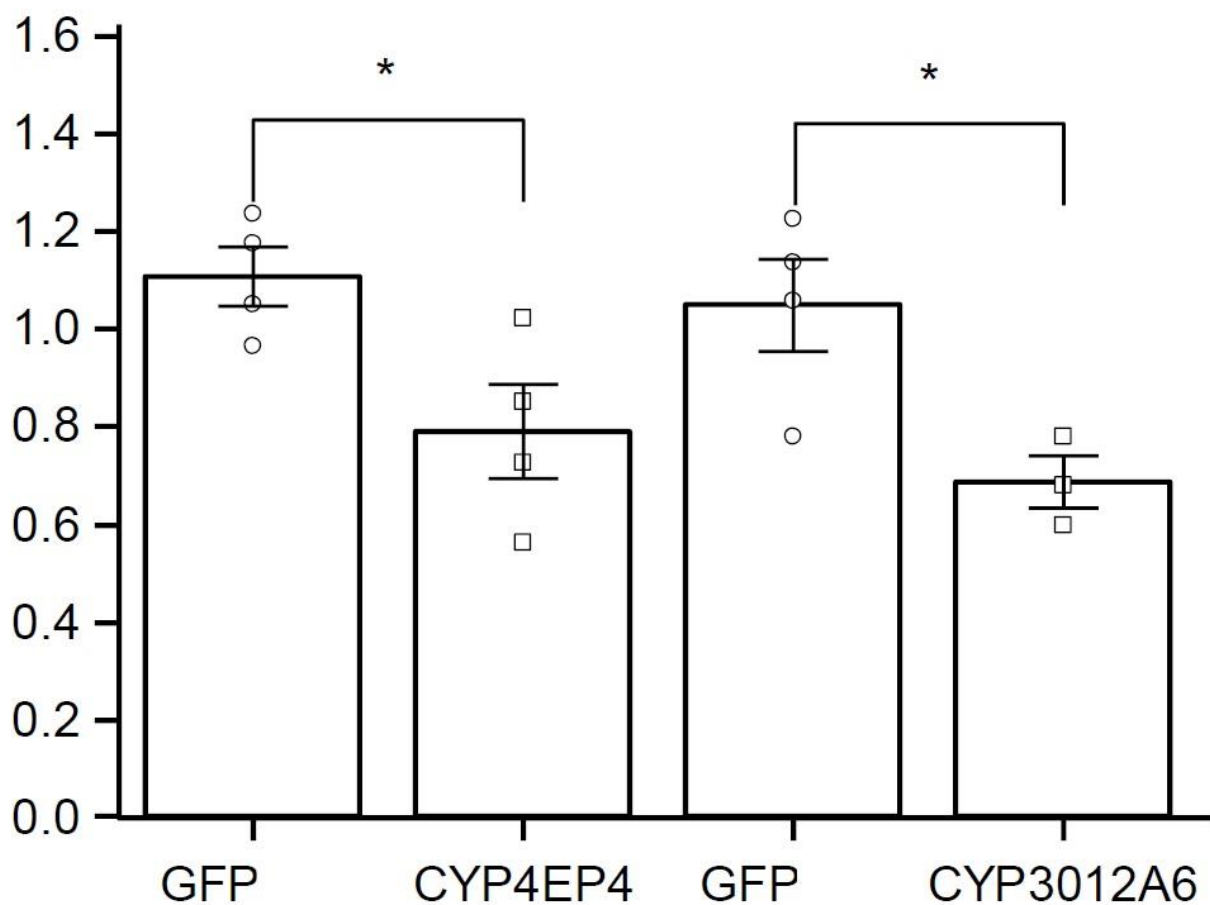
Έχοντας αποδείξει ότι η υποέκφραση των δυο P450s (*CYP3012A6* και *CYP4EP4*) στα AN-CR βαρρόα, σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στο Coumaphos, έγινε χρήση της τεχνικής RNAi για να προκληθεί σίγηση αυτών των CYPs σε ευαίσθητα ακάρεα του πληθυσμού ATH-S. Σκοπός ήταν η μίμηση της υποέκφρασης των δυο P450s στα ανθεκτικά βαρρόα. Η σίγηση της *CYP4EP4* προκάλεσε σημαντική μείωση της θνησιμότητας των ευαίσθητων βαρρόα κατά 35%, στη διαγνωστική δόση των 200 ppm Coumaphos. Τα βαρρόα που είχαν επωαστεί σε dsGFP και είχαν χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας, εμφάνισαν θνησιμότητα 90.48% (95% CI = 84.92-96.04%). Τα βαρρόα που επωάστηκαν σε *dsCYP4EP4* εμφάνισαν θνησιμότητα 58.33% (95% CI = 48.16-68.50%). Αντίθετα, στα βαρρόα που προκλήθηκε σίγηση της *CYP3012A6* δεν υπήρχε σημαντική μείωση θνησιμότητας σε σύγκριση με τον μάρτυρα (εικόνα 2.6). Η σίγηση της *CYP4EP4* στα ευαίσθητα ATH-S βαρρόα, προκάλεσε σημαντική μείωση της ενεργοποίησης του Coumaphos στο ενεργό και τοξικό μεταβολίτη Coroxon. Αντίθετα, η σίγηση με GFP και *CYP3012A6* δεν προκάλεσαν κάποια αντίστοιχη μείωση των επιπέδων σχηματισμού του Coroxon (εικόνα 2.7). Η αποτελεσματικότητα της σίγησης επιβεβαιώθηκε και από τη στατιστικά σημαντική μείωση των *CYP4EP4* (28.7% SE=10.3%, P=0.032) και *CYP3012A6* (34.59% SE=11.6%, P=0.031) επιπέδων mRNA, σε σύγκριση με τον μάρτυρα GFP (εικόνα 2.8).



Εικόνα 2.6: Ποσοστιαία θνησιμότητα των ευαίσθητων ακάρεων (ATH-S) ύστερα από σίγηση στοχευμένων γονιδίων με τη μέθοδο παρεμβολής RNA (RNAi) και έκθεση στη διαγνωστική δόση Coumaphos (200ppm)



Εικόνα 2.7. Ανάλυση μεταβολιτών με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, μετά από επώαση ευαίσθητων Βαρρόα(ATH-S) σε *dsRNA* και *in vivo* έκθεση σε [^{14}C] coumaphos.



Εικόνα 2.8: Έκφραση των επιπέδων mRNA σε ευαίσθητα ακάρεα (ATH-S) ύστερα από σίγηση στοχευμένων γονιδίων με τη μέθοδο παρεμβολής RNA (RNAi)

2. 5 Συζήτηση

Εντοπίστηκε και αποσαφηνίστηκε σε μοριακό επίπεδο μια ασυνήθιστη περίπτωση μειωμένης ενεργοποίησης προεντομοκτόνου που προσέφερε πολύ υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στο ακαρεοκτόνο Coumaphos για το εκτοπρασιτικό άκαρι των μελισσών *V. destructor*. Πολλές οργανοφωσφορικές ενώσεις, που κυριάρχησαν στην αγορά εντομοκτόνων τη δεκαετία του 1970-1980, είναι φωσφοροθειϊκές (με ένα δεσμό P=S). Πρόκειται για προεντομοκτόνα, με 4-5 φορές χαμηλότερη αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης από αυτή του ενεργοποιημένου μεταβολίτη τους, των αντίστοιχων φωσφορικών αλάτων (P=O). Το βήμα ενεργοποίησης μπορεί να οδηγήσει σε επιλεκτική τοξικότητα. Για παράδειγμα, το μαλαθείο αδρανοποιείται γρήγορα από τις καρβοξυλεστεράσες των θηλαστικών, ενώ τα έντομα το ενεργοποιούν σε μαλαοxon. Το βήμα ενεργοποίησης P=S σε P=O καταλύεται από τα CYP, για

παράδειγμα στην οικιακή μύγα (*Musca domestica*) με CYP6A1 και CYP12A1 (Guzon et al. 1998; Sabourault et al. 2001).

Στην μελέτη αυτή αποδεικνύεται, ότι η μειωμένη ενεργοποίηση με τη μεσολάβηση του CYP στο *Varroa* εμπλέκεται στην ανθεκτικότητα του *Coumaphos*. Οι βιοδοκιμές με *coroxon*, οι οποίες παρέκαμψαν το στάδιο ενεργοποίησης των CYP, μείωσαν την ανθεκτικότητα του AN-CR από 217 φορές για το *coumaphos*, σε 25 φορές για το *coroxon*. Το σύμπλεγμα CYP στο *Varroa* είναι περιορισμένο (N= 26) το οποίο είναι σύνηθες σε παρασιτικούς οργανισμούς. Η ψείρα του ανθρώπινου σώματος *Pediculus humanus* έχει 37 γονίδια CYP (Lee et al. 2011) και η ψείρα του σολομού *Lepeophtheirus salmonis* μόλις 21 (Humble et al. 2019). Υπήρχε διαφορετική έκφραση των τριών CYP, ενός υπερεκφρασμένου (CYP4DP24 από την ομάδα CYP4) και δύο υποεκφρασμένων (CYP3012A6 και CYP4EP4 από τη μιτοχονδριακή και CYP4 ομάδα, αντίστοιχα) στα ανθεκτικά AN-CR σε σύγκριση με τα ευαίσθητα ακάρεα ATH-S. Οι αλλαγές γονιδιακής έκφρασης μετά την έκθεση σε 200 ppm *coumaphos* στον ανθεκτικό πληθυσμό AN-CR ήταν αμελητέες.

Οι αλλαγές στα επίπεδα CYP και προς τις δύο κατευθύνσεις θα μπορούσαν θεωρητικά να οδηγήσουν σε ανθεκτικότητα. Αυτό οφείλεται στο ότι τα ένζυμα CYP που στοχεύουν τον φωσφοροθειϊκό δεσμό (P=S) των οργανοφωσφορικών ενώσεων δημιουργούν πρώτα ένα μονοοξυγονωμένο, ασταθές ενδιάμεσο παράγωγο το οποίο μπορεί στη συνέχεια να οδηγήσει σε δύο αποτελέσματα (βλ. Εικόνα 1.6 για *coumaphos*, που δείχνει τους κύριους ραδιοσημασμένους μεταβολίτες). Το ένα αποτέλεσμα είναι η διάσπαση εστέρα και ο σχηματισμός του μη τοξικού μεταβολίτη *chlorferon* και το άλλο αποτέλεσμα είναι η αποθείωση και ο σχηματισμός του ενεργοποιημένου, τοξικού ακαρεοκτόνου *coroxon*. Η αναλογία των δύο προϊόντων εξαρτάται από το υπόστρωμα και το CYP. Για το *coumaphos*, ένα CYP που καταλύει υψηλή αναλογία *coroxon*/*chlorferon* θα ευνοούσε την ενεργοποίηση έναντι της αποτοξικοποίησης. Η υποέκφρασή αυτού του CYP μπορεί να οδηγήσει σε ανθεκτικότητα και αντίστροφα (εικόνα 2.9).

Η ανάλυση του μεταβολισμού του *coumaphos* έδειξε ότι δεν υπήρχε διαφορά μεταξύ των στελεχών ATH-S και AN-CR στον σχηματισμό του *chlorferon* ή στην μείωση του *coumaphos*. Ωστόσο, ο σχηματισμός *coroxon* μειώθηκε στα ανθεκτικά ακάρεα. Έτσι, η υποέκφραση ενός CYP στον ανθεκτικό πληθυσμό με συνέπεια τη μειωμένη ενεργοποίηση του *Coumaphos* σε *Coroxon* είναι ο πιο πιθανός μηχανισμός ανθεκτικότητας.

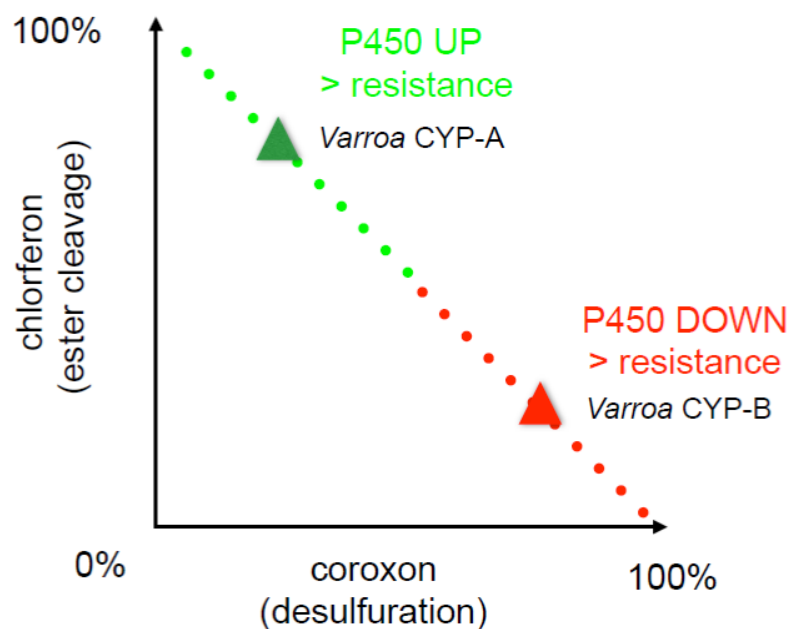
Ο μηχανισμός ανθεκτικότητας επιβεβαιώθηκε λειτουργικά χρησιμοποιώντας την αντίστροφη γενετική των δύο υποεκφραζόμενων CYPs. Η παρεμβολή RNA (RNAi) του υποεκφρασμένου *CYP4EP4* στο ευαίσθητο στέλεχος μείωσε την ενεργοποίηση του coumaphos και αύξησε την ανθεκτικότητα στο coumaphos. Έτσι, αυτός ο αντίστροφος γενετικός χειρισμός μιμείται τη μακροπρόθεσμη επιλογή για την υποέκφραση του *CYP4EP4*, με παρόμοιο αποτέλεσμα. Η έκφραση του *CYP4EP4* είναι ~20 φορές υψηλότερη από το *CYP3012A6*. Η σίγαση του *CYP3012A6* δεν άλλαξε τον φαινότυπο ανθεκτικότητας, είτε επειδή αυτή η CYP δεν μεταβολίζει το coumaphos είτε επειδή το επίπεδο έκφρασής του είναι πολύ χαμηλό για να επηρεάσει τη παραγωγή του coroxon.

Οι περισσότερες μελέτες για την ανθεκτικότητα των OP εντομοκτόνων έχουν τεκμηριώσει την υπερέκφραση των γονιδίων CYP που δημιουργούν υψηλή αναλογία διάσπασης εστέρα (αποτοξικοποίηση)/ αποθείωσης (ενεργοποίηση), όπως το *CYP6A1* σε οικιακές μύγες ανθεκτικές στο diazinon (RR 2,66, (Sabourault et al. 2001)). Βέβαια δεν έχουν αναφερθεί παραδείγματα του αντίστροφου, δηλαδή μειωμένα επίπεδα ενζύμων με υψηλότερους αναλογίες αποθείωσης/διάσπασης εστέρα. Ωστόσο, η ανθεκτικότητα στο μεθυλο-παραθείο ενός στελέχους πεδίου *Heliothis virescens* συσχετίστηκε με χαμηλότερη μικροσωμική ενεργοποίηση σε μεθυλο-παραοξόν (Konno et al. 1989). Αυτή η περίπτωση είναι παρόμοια με τον μηχανισμό που περιγράφεται στην παρούσα μελέτη για την ανθεκτικότητα του Βαρρόα στο coumaphos.

Η πιθανότητα ότι πρόσθετοι μηχανισμοί μπορεί επίσης να παίζουν ρόλο στην ανθεκτικότητα στο coumaphos δεν μπορεί να αποκλειστεί, καθώς οι τοξικολογικές δοκιμές με coroxon εξακολουθούν να επιτρέπουν ένα συντελεστή ανθεκτικότητας (RR) ίσο με 25. Επίσης, η μειωμένη δραστηριότητα GST με το υπόστρωμα MCB και η υποέκφραση των GSTs (Πίνακας 2.6) στο AN-CR μπορεί να έχει άμεσο ή υποστηρικτικό ρόλο στον φαινότυπο ανθεκτικότητας.

Οι παρασιτισμοί από βαρρόα συνδέονται με σοβαρές οικονομικές απώλειες στη μελισσοκομία και το coumaphos είναι ένα από τα λίγα ακαρεοκτόνα που είναι διαθέσιμα παγκοσμίως για την καταπολέμηση του. Η παρουσία και η συχνότητα αυτού του μηχανισμού ανθεκτικότητας στο coumaphos μπορεί τώρα να μελετηθεί, για να εκτιμηθεί εάν προκαλεί ανθεκτικότητα στο coumaphos και σε άλλα μέρη του κόσμου. Εάν ο μηχανισμός ανθεκτικότητας είναι εκτεταμένος και δεν περιορίζεται στα ελληνικά νησιά του Αιγαίου, τα διαφορετικά προφίλ ενεργοποίησης ή αποτοξικοποίησης διαφορετικών ακαρεοκτόνων από την ίδια CYP, θα μπορούσαν ενδεχομένως να δημιουργήσουν νέες επιλογές για τη διαχείριση

φαινομένων ανθεκτικότητας εντομοκτόνων (IRM). Για παράδειγμα, οι Adolphi et al. (2019) (36) έδειξαν ότι η υπερέκφραση του AgCYP6M2 CYP στο *Anopheles* προσδίδει ανθεκτικότητας στο permethrin μέσω αποτοξικοποίησης και αυξάνει την ευαισθησία στο μαλαθείο, μέσω της βιοενεργοποίησής του στον πιο τοξικό μεταβολίτη μαλαοxon. Ομοίως, ανθεκτικά στα πυρεθροειδή *H. virescens* είναι πιο ευαίσθητα στο προ-εντομοκτόνο chlorfenapyr (Pimprale et al. 1997). Αυτή η αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα μεταξύ διαφορετικών κατηγοριών εντομοκτόνων/προ-εντομοκτόνων, λόγω της διαφορικής έκφρασης των CYPs σε ανθεκτικά έντομα, θα μπορούσε να αξιοποιηθεί σε μια στρατηγική push-pull του IRM.



Εικόνα 2.9: Αλλαγές στην έκφραση των CYPs ενδέχεται να προσδώσουν ανθεκτικότητα του *Varroa* στο Coumaphos (Vlogiannitis et al.2021).

Κεφάλαιο 3. Ανίχνευση και παρακολούθηση ανθεκτικότητας στόχου σε πυρεθροειδή πληθυσμών Βαρρόα από περιοχές της Ελλάδας και του Βελγίου, με μοριακά διαγνωστικά.

3.1 Περίληψη

Το εκτοπαράσιτο των μελισσών *Varroa destructor* θεωρείται η κύρια απειλή για τη μελισσοκομία, καθώς οι αποικίες μελισσών *Apis mellifera* στις οποίες δεν έχει πραγματοποιηθεί θεραπεία συνήθως καταρρέουν μέσα σε λίγα χρόνια. Για να γίνει έλεγχος του ακάρεος, πολλοί μελισσοκόμοι βασίζονται σε περιορισμένο αριθμό εγκεκριμένων συνθετικών ακαρεοκτόνων, συμπεριλαμβανομένων των πυρεθροειδών tau-fluvalinate και flumethrin. Λόγω της εντατικής χρήσης αυτών των προϊόντων, έχει επέλθει ανθεκτικότητα του παρασίτου και είναι πλέον συνηθισμένη σε πολλές μελισσοκομικές περιοχές σε όλο τον κόσμο. Στην τρέχουσα μελέτη, η εμφάνιση υποκαταστάσεων αμινοξέων στη θέση 925 στο κανάλι μεταφοράς ιόντων νατρίου (Voltage Gated Sodium Channel – VGSC), μελετήθηκε σε πληθυσμούς *Varroa* που συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές της Ελλάδας και στη Φλάνδρα του Βελγίου. Εργαστηριακές βιοδοκιμές δόσης-απόκρισης επιβεβαιώνουν τη συμμετοχή της συχνά παρατηρούμενης μεταλλαγής L925V στην ανθεκτικότητα στο Flumethrin, με αποτέλεσμα την αύξηση του LC50 κατά 12.64 φορές σε έναν πληθυσμό *Varroa* που αποτελείται κυρίως από ομόζυγα ακάρεα 925 V/V. Με την παρουσία υποκαταστάσεων L925 σε περίπου τέσσερα στα δέκα μελισσοκομεία που ελέγχθηκαν, η χρήση πυρεθροειδών ακαρεοκτόνων στη Φλάνδρα, θα πρέπει να εξεταστεί προσεκτικά. Επιπρόσθετα, η μοριακή ανάλυση των δειγμάτων που συλλέχθηκαν, από περιοχές της Ελλάδας, υποδεικνύει τη παρουσία υποκαταστάσεων L925 σε οχτώ στα δέκα μελισσοκομεία που εξετάστηκαν, στοιχειοθετώντας τη σημαντικότητα των στοχευμένων επεμβάσεων έναντι της Βαρροϊκής ακαρίασης.

3.2 Εισαγωγή

Τα πυρεθροειδή ήταν από τα πρώτα ακαρεοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν για την καταπολέμηση του *Varroa destructor*. Η ισχυρή εκλεκτική τους δράση έναντι του παρασίτου, χωρίς να επηρεάζουν τις μέλισσες τα κατέστησε ως σημαντικό όπλο στη φαρέτρα των μελισσοκόμων. Έχοντας ως σημείο στόχο το νευρικό σύστημα των εντόμων και πιο συγκεκριμένα το κανάλι μεταφοράς ιόντων νατρίου (Voltage Gated Sodium Channel – VGSC), ο πιο συχνά αναφερόμενος μηχανισμός ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή είναι σημειακή μετάλλαξη εντός του VGSC (πληροφορίες 1.6.2 Χημική καταπολέμηση).

Τα πυρεθροειδή ακαρεοκτόνα που χρησιμοποιούνται στη μελισσοκομία είναι οι δ.ο *Flumethrin* και *tau-Fluvalinate*, όμως η εκτεταμένη και επαναλαμβανόμενη χρήση των δραστικών αυτών έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε διάφορες περιοχές του κόσμου. Επομένως η ανάλυση της συχνότητας και ροής γονιδίων ανθεκτικότητας στόχου σε πυρεθροειδή ακαρεοκτόνα πληθυσμών Βαρρόα από διάφορες περιοχές της Ελλάδας και του Βελγίου, μας δίνει σημαντικά δεδομένα όσον αφορά την παρακολούθηση της εξέλιξης του φαινομένου της ανθεκτικότητας, σε δύο χώρες με διαφορετικό προσανατολισμό όσον αφορά την διαχείριση της Βαρροϊκής ακαρίασης. Επιπλέον, σημαντικό εύρημα αποτελεί η συσχέτιση της παρουσίας μεταλλαγής L925V στο VGSC με ανθεκτικότητα των Βαρρόα στη δ.ο *Flumethrin*, εκτελώντας βιοδοκιμές πλήρης απόκρισης σε πληθυσμό Βαρρόα με υψηλή συχνότητα εμφάνισης της μεταλλαγής και συγκρίνοντας το με φυσικό πληθυσμό Βαρρόα, που δεν υπήρχε παρουσία της μεταλλαγής.

3.3 Υλικά και Μέθοδοι

3.3.1 Χημικές ουσίες

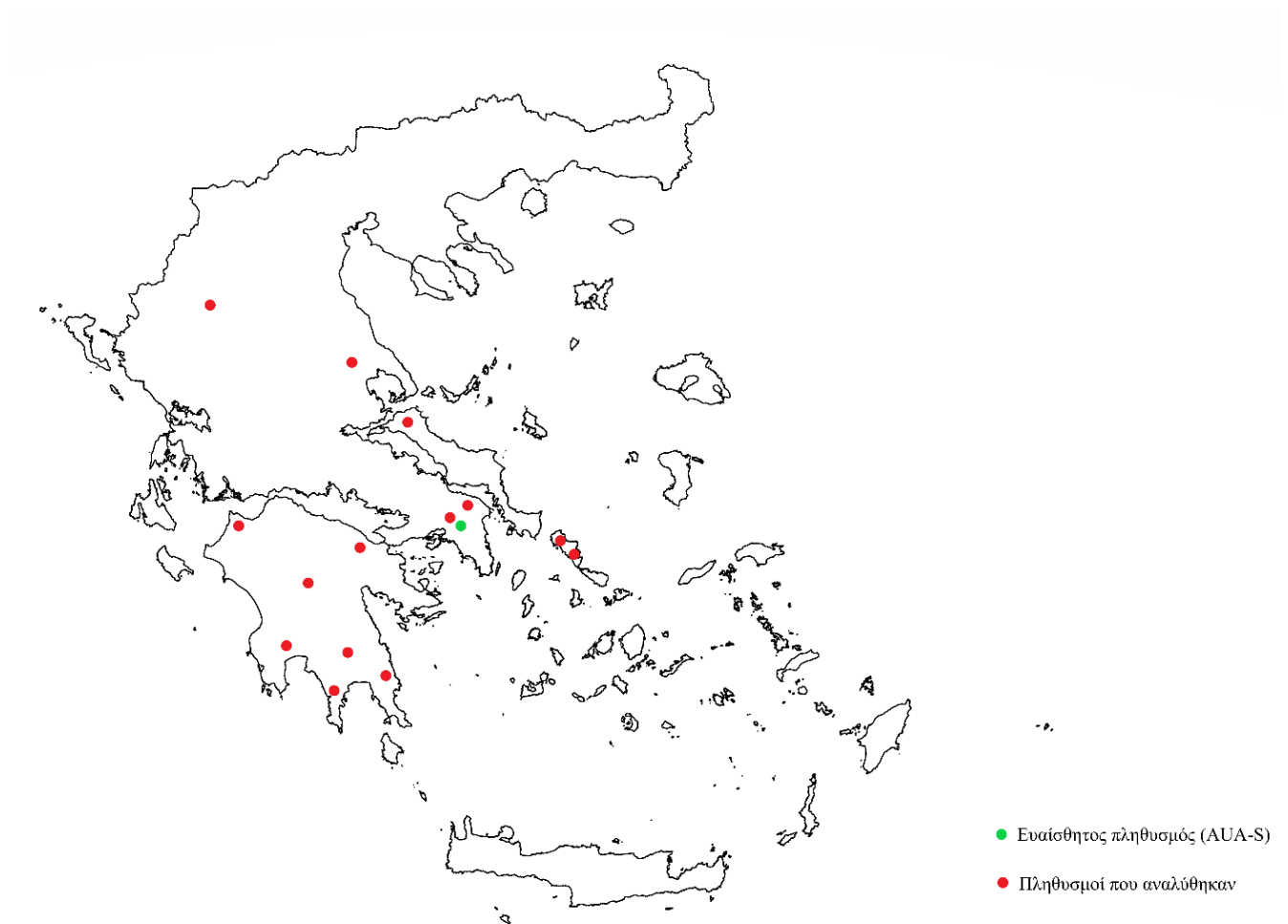
Η παρακάτω δραστική ουσία χρησιμοποιήθηκε για τις βιοδοκιμές: *Flumethrin* 98% καθαρότητα (Sigma Aldrich, Ελλάδα).

3.3.2 Βιολογικό υλικό

Η ανάλυση ανθεκτικότητας του *Varroa* στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα έγινε σε εθνικό επίπεδο Ελλάδος με μοριακή ανάλυση πληθυσμών από διάφορες περιοχές της χώρας καθώς και σε επίπεδο κοινότητας του Βελγίου με μοριακή ανάλυση πληθυσμών από διάφορες περιοχές της Φλαμανδικής περιοχής του βόρειου Βελγίου. Ως βιολογικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν αποκλειστικά ενήλικα θηλυκά άτομα Βαρρόα.

3.3.2.1 Πληθυσμοί *Varroa* από περιοχές της Ελλάδας

Συλλέχθηκαν δεκατέσσερις πληθυσμοί Βαρρόα από διάφορες περιοχές της χώρας κατά τα έτη 2019 έως 2021 (Εικόνα 3.1). Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε από μελισσοκόμους που διατηρούσαν τουλάχιστον 20 κυψέλες μελισσών και συνοδεύτηκε από αποστολή τουλάχιστον 2 πλαισίων με σφραγισμένο γόνο στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, ενώ πραγματοποιήθηκε καταγραφή του ιστορικού θεραπευτικών επεμβάσεων των μελισσοκόμων για τη βαρροϊκή ακαρίαση. Επίσης συλλέχθηκε ένας ακόμα πληθυσμός από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών και χαρακτηρίστηκε ως ευαίσθητος καθότι είχε διατηρηθεί χωρίς χημική καταπολέμηση τουλάχιστον για τα τελευταία 20 χρόνια (συντομογραφία ATH-S, Athens Susceptible). Η συλλογή των πληθυσμών Βαρρόα συνοδεύτηκε από ερωτηματολόγιο για το ιστορικό εφαρμογών με ακαρεοκτόνα για τα τελευταία πέντε χρόνια από τη στιγμή της δειγματοληψίας. Συνολικά, αναλύθηκαν 263 βαρρόα για την παρουσία γνωστών μεταλλαγών ανθεκτικότητας στην έλικα IIS5 του VGSC (Πίνακας 3.1).

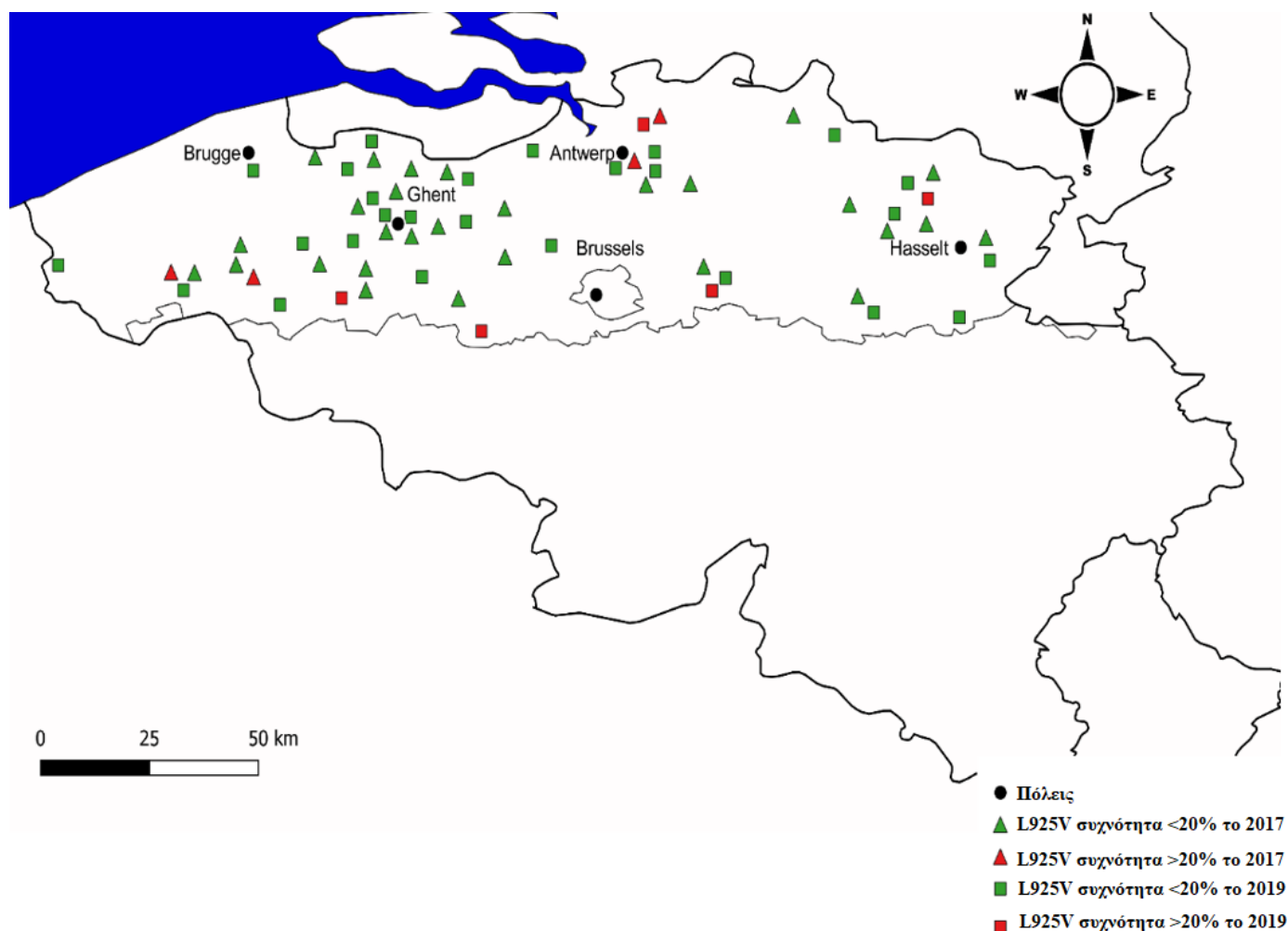


Εικόνα 3.1. Χωρική απεικόνιση πληθυσμών Βαρρόα, από περιοχές της Ελλάδας, που αναλύθηκαν.

3.3.2.2 Πληθυσμοί *Varroa* από περιοχές του Βελγίου (Φλάνδρα)

Συλλέχθηκαν πληθυσμοί Βαρρόα από μελισσοκομεία του βόρειου Βελγίου (Φλάνδρα) και τη διάρκεια δύο μελισσοκομικών περιόδων (2017 και 2019). Πιο συγκεκριμένα, τα Βαρρόα συλλέχθηκαν από μελισσοκόμους, σε παγίδα που τοποθετήθηκε στη βάση της κυψέλης κατά τη διάρκεια περιόδου που δε πραγματοποιήθηκε θεραπεία με ακαρεοκτόνο (Μάρτιο–Απρίλιο). Συνολικά, συγκεντρώθηκαν δείγματα βαρρόα από 55 διαφορετικές περιοχές (Εικόνα 3.2), από τις οποίες οι 32 πληθυσμοί συλλέχθηκαν την άνοιξη του 2017, 31 πληθυσμοί την άνοιξη του 2019 ενώ 8 πληθυσμοί συλλέχθηκαν και για τις δύο περιόδους. Η συλλογή των πληθυσμών Βαρρόα συνοδεύτηκε από ερωτηματολόγιο για το ιστορικό εφαρμογών με πυρεθροειδή ακαρεοκτόνα (PolyVar Yellow, Bayvarol, Apistan) για τα τελευταία τέσσερα

χρόνια (2016,2017,2018,2019), στις κυψέλες που πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία. Συνολικά, αναλύθηκαν 1017 βαρρόα για την παρουσία γνωστών μεταλλαγών ανθεκτικότητας στην έλικα IIS5 του VGSC (Πίνακας 3.2).



Εικόνα 3.2. Χωρική απεικόνιση πληθυσμών Βαρρόα, από περιοχές του βόρειου Βελγίου (Φλάνδρα), που αναλύθηκαν.

3.3.3 Συλλογή βιολογικού υλικού

Για τη δειγματοληψία πληθυσμών Βαρρόα από περιοχές της Ελλάδας, ακολουθήθηκε η διαδικασία όπως «2.3.2 Βιολογικό υλικό».

Για τη δειγματοληψία πληθυσμών Βαρρόα από περιοχές του β. Βελγίου, η λήψη των δειγμάτων έγινε από τους μελισσοκόμους και μεταφέρθηκαν σε συνθήκες ψύχους σε εργαστηριακό χώρο μέχρι τη περαιτέρω ανάλυση τους. Επιπλέον, ακολουθήθηκε και η διαδικασία όπως «2.3.2 Βιολογικό υλικό» για την συγκέντρωση ζωντανών ακάρεων βαρρόα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή βιοδοκιμών.

3.3.4 Βιοδοκιμές

Η υψηλής καθαρότητας δ.ο *Flumethrin* (>95% καθαρότητα, Sigma Aldrich) διαλύθηκε, με τη χρήση του οργανικού διαλύτη Ακετόνη, με στόχο τη δημιουργία διαλύματος υψηλής συγκέντρωσης (Stock Solution) και το οποίο διατηρήθηκε σε θερμοκρασία -20°C . Πριν τη πραγματοποίηση των βιοδοκιμών παρασκευάζονταν φρέσκα διαλύματα διαφόρων συγκεντρώσεων και ποσότητα 0.5 mL διαλύματος από κάθε συγκέντρωση τοποθετούταν εντός ξεχωριστών γυάλινων φιαλιδίων (Vials) (Kimble, 60965D-3). Τα vials περιστρέφονταν ούτως ώστε να διαμοιραστεί ομοιόμορφα εντός αυτών η δ.ο. Καθώς η ακετόνη εξατμιζόταν, δημιουργήθηκε ένα λεπτό στρώμα εντομοκτόνου από την εσωτερική επιφάνεια των vials, η οποία υπολογίστηκε στα 36.45 cm^2 . Τα εμποτισμένα vials αφέθηκαν τουλάχιστον δύο ώρες για να στεγνώσουν, πριν χρησιμοποιηθούν για τις βιοδοκιμές.

Στη συνέχεια ομάδες των 10 ατόμων ενήλικων Βαρρόα, τοποθετήθηκαν εντός των εμποτισμένων vials και σφραγίζονταν με το ειδικό πώμα. Σε κάθε περίπτωση τα vials τοποθετήθηκαν εντός επωαστικού θαλάμου, σε συνθήκες σκότους, στους 25°C για 20 ώρες. Μετά το πέρας των 20 ωρών, πραγματοποιούνταν καταμέτρηση της θνησιμότητας των ακάρεων. Ως νεκρά χαρακτηρίζονταν τα ακάρεα τα οποία δεν μπορούσαν να περπατήσουν μετά το ελαφρύ ακούμπημα με πινέλο. Απόρροια των αποτελεσμάτων ήταν η δημιουργία καμπύλης τοξικότητας για την εκάστοτε δ.ο. Τα αποτελέσματα τοξικότητας αναλύθηκαν με τη χρήση του προγράμματος PoloPC (LeoRA, Software, Berkeley, CA, USA). Οι συντελεστές ανθεκτικότητας (Resistance Ratio – RR) υπολογίστηκαν διαιρώντας το LC_{50} του προς εξέταση πληθυσμού με το LC_{50} του ευαίσθητου πληθυσμού/αναφοράς (DE-FS).

3.3.5 Απομόνωση DNA, ενίσχυση και αλληλούχιση τμήματος VGSC.

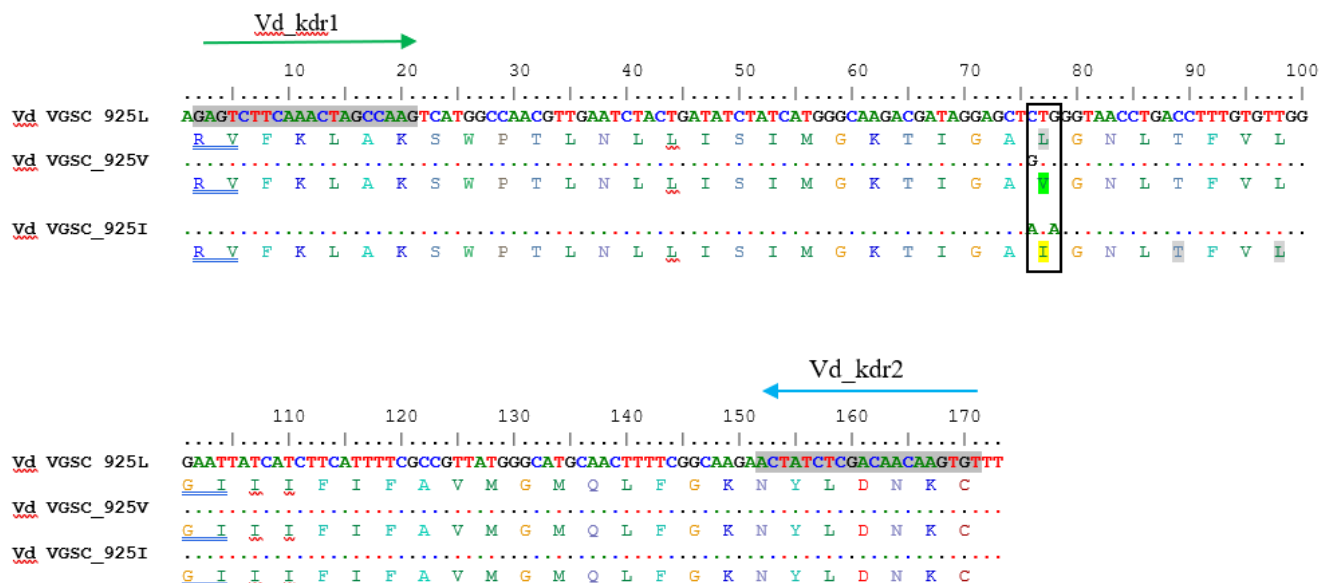
Πραγματοποιήθηκαν μοριακά διαγνωστικά στους πληθυσμούς Βαρρόα που συλλέχθηκαν από τις περιοχές της Ελλάδας και του Βέλγιου. Τα μοριακά διαγνωστικά για την ανίχνευση της ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα συνοδεύτηκαν από απομόνωση γενωμικού DNA των Βαρρόα, ενίσχυση και αλληλούχιση τμήματος VGSC, στο οποίο περιέχονται γνωστές μεταλλαγές (L925V/I) που προσδίδουν την ανθεκτικότητα (Alissandrakis et al. 2017). Η πραγματοποίηση των μοριακών διαγνωστικών έγινε σύμφωνα με το «3.3.5.1

Μοριακά διαγνωστικά για την ανίχνευση της ανθεκτικότητας του *Varroa destructor* στα πυρεθροειδή ακαρεοκτόνα».

Οι δύο πληθυσμοί (ATH-S, WP-FR) που χρησιμοποιήθηκαν στις βιοδοκιμές, αλληλουχήθηκαν με τον εμπρόσθιο και τον αντίστροφο εκκινητή. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων αλληλούχισης έγινε με το λογισμικό BioEdit v.7.0.5.3 (Hall 1999) χρησιμοποιώντας την VGSC αλληλουχία της *Musca domestica* (GenBank Acc. No. X96668) ως πρότυπη για την αρίθμηση. Η χωρική ανάλυση των αναλυθέντων *Varroa* πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό GRASS (Geographic Resources Analysis Support System) v.7.6.1 (GRASS Development Team 2019)

3.3.5.1 Μοριακά διαγνωστικά για την ανίχνευση της ανθεκτικότητας του *Varroa destructor* στα πυρεθροειδή ακαρεοκτόνα.

Το μοριακό διαγνωστικό για την ανίχνευση της ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα βασίστηκε στη μέθοδο PCR και σχεδιάστηκε ώστε να εντοπίζει την παρουσία ή όχι των *kdr* αλληλόμορφων (L925V/I) σε άτομα *Varroa destructor*. Αυτή η ανάλυση χρησιμοποιεί τους εκκινητές *Vd_kdr1* και *Vd_kdr2* που πλαισιώνουν τη περιοχή όπου περιέχεται η *kdr* μεταλλαγή και ενισχύει ένα τμήμα γενωμικού DNA 170 ζεύγων βάσεων (bp) (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3. Νουκλεοτιδική αλληλουχία τμήματος από το διαμεμβρανικό κανάλι μεταφοράς ιόντων νατρίου που αποτελεί στόχο των πυρεθροειδών και στο οποίο περιέχεται η μεταλλαγή L925I/V

Πιο συγκεκριμένα ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

Ομογενοποίηση ενήλικων ατόμων *Varroa* και απομόνωση γενωμικού DNA

Γενωμικό DNA απομονώθηκε από μεμονωμένα ακμαία θηλυκά άτομα. Πιο συγκεκριμένα:

1. Μεμονωμένα άτομα *Varroa* ομογενοποιήθηκαν σε μείγμα (5M NaCl, 1M Tris HCl pH:8, H₂O, Πρωτεΐνάση K 10mg/ml) τελικού όγκου 52 μl , με ειδικό ομογενοποιητή που εφαρμόζει σε 1.5 ml Eppendorf tube.
2. Έγινε επώαση του δείγματος για 60 λεπτά στους 55°C και ακολούθως για 5 λεπτά στους 85°C
3. Φυγοκέντρωση σε 10000×g, για 5 λεπτά και απομάκρυνση των αδιάλυτων συστατικών.
4. Μεταφορά του υπερκείμενου διαλύματος σε 1,5ml eppendorf tube. Το υπερκείμενο διάλυμα αποτελεί την πηγή του γενωμικού DNA.

PCR για την ανάκτηση και ενίσχυση τμήματος του γονιδίου στόχου.

Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της PCR με σκοπό την ανάκτηση και ενίσχυση τμήματος του γονιδίου στόχου των πυρεθροειδών sodium channel (διαμεμβρανικά κανάλια μεταφοράς ιόντων νατρίου), στο οποίο περιέχεται η μεταλλαγή L925I/V και η παρουσία της οποίας έχει συσχετιστεί με την ανθεκτικότητα του *Varroa* στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα (Cabrerá et.al 2013).

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθοι:

Εμπρόσθιος εκκινητής (Vd_kdr1): 5'GAGTCTTCAAACCTAGCCAAG 3'

Αντίστροφος εκκινητής(Vd_kdr2): 5' ACACTTGTTGTGCGAGATAGT 3'

Και για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν τα συστατικά που περιγράφονται στον Πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1: Συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη διενέργεια μιας αντίδρασης PCR

	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ
gDNA	2 ul
10x buffer (περιέχει. 15mM MgCl ₂)	2.5 ul
10mM dNTPs	0.5 ul
10uM Vd_kdr1	0.5 ul

10uM Vd_kdr2	0.5 ul
Kapa Taq	0.1ul
H ₂ O	18.9 ul
Total	25 ul

Το αναμενόμενο μέγεθος της αντίδρασης ήταν 170bp και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε 35 κύκλους ενίσχυσης σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα (Πίνακας 3.2).

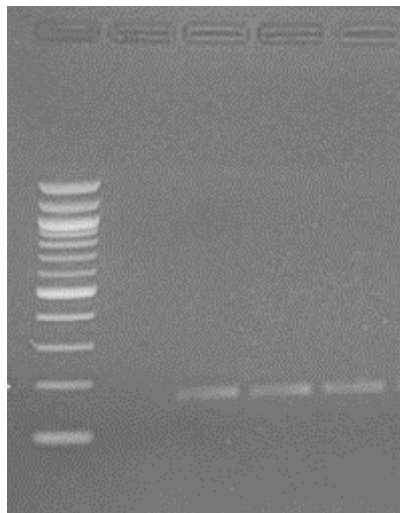
Πίνακας 3.2: Πρόγραμμα PCR για τον πολλαπλασιασμό του επιθυμητού τμήματος DNA μεγέθους 170bp.

ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ PCR	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (°C)	ΧΡΟΝΟΣ
1. Αρχική αποδιάταξη	95	3 min
2. Αποδιάταξη	95	30 sec
3. Υβριδισμός εκκινητών	55	30 sec
4. Επιμήκυνση	72	30 sec
Επανάληψη σταδίων 2-4 για 34 φορές.		
5. Τελική επιμήκυνση	72	2 min

Ηλεκτροφόρηση και καθαρισμός προϊόντων PCR

Τα προϊόντα των αντιδράσεων ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,0 % (w/v). Η ηλεκτροφόρηση είναι μια συνηθισμένη εργαστηριακή τεχνική για τον διαχωρισμό τμημάτων DNA βάσει μεγέθους φορτίου. Εντός κωνικής φιάλης διαλύθηκε 1 γρ. αγαρόζης σε 100 ml TAE 1x. Ακολούθησε θέρμανση του διαλύματος έως ότου αυτό έγινε διαυγές και στο τέλος προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 1 μg/mL. Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ειδικό εκμαγείο που έφερε προσαρμοσμένα χτένια (combs) έως ότου πήξει. Το πήκτωμα αγαρόζης μεταφέρθηκε σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TAE και ακολούθησε η τοποθέτηση των προϊόντων της PCR στις εσοχές που είχαν σχηματιστεί από τα ειδικά χτένια. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιήθηκε στα 80 V για 45 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα μεταφέρεται σε ειδική τράπεζα εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας όπου λαμβάνονται φωτογραφίες μέσω ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής. Η επιτυχής απομόνωση

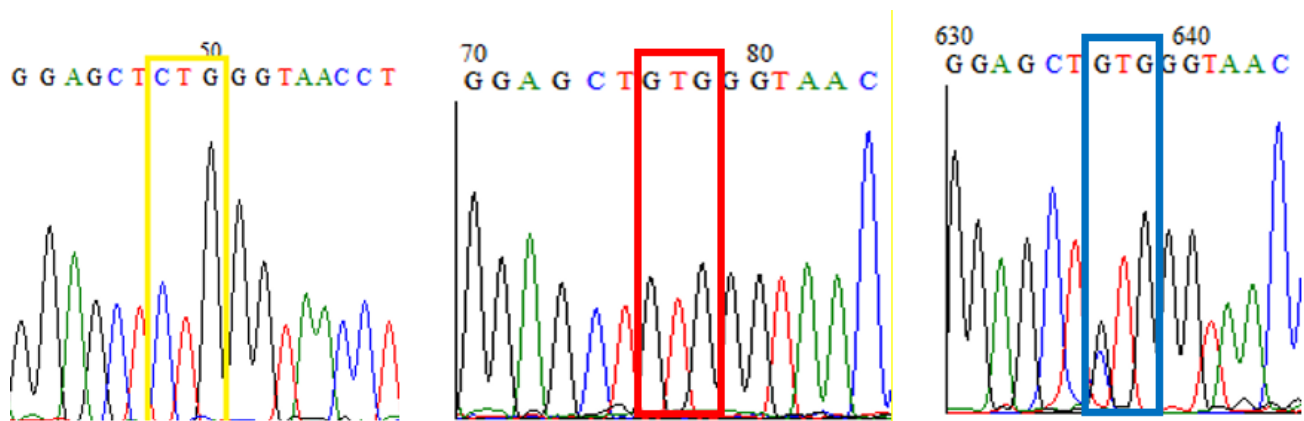
γενωμικού DNA και η επιτυχής αντίδραση της τεχνικής PCR μπορεί να διαπιστωθεί μέσω της παρουσίας μια ευδιάκριτης ζώνης μεγέθους 170 bp που αντιστοιχεί στο τμήμα των διαμεμβρανικών καναλιών μεταφοράς ιόντων νατρίου στο οποίο περιέχεται η μεταλλαγή L925I/V (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4. Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR (170bp) από 3 δείγματα *Varroa destructor* σε πήκτωμα αγαρόζης (1,0 % w/v).

Αλληλούχιση και αξιολόγηση αποτελεσμάτων

Το προϊόν της PCR μετά από καθαρισμό με χρήση του εμπορικού kit (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up της εταιρίας Macherey-Nagel) στάλθηκε για αλληλούχιση με τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR στην εταιρεία MacroGen (Amsterdam). Οι αλληλουχίες που αποκτήθηκαν, αναλύθηκαν με το πρόγραμμα Bioedit 7.2.5. Στα χρωματογραφήματα (Εικόνα 3.5) αποτυπώνεται η ύπαρξη ή μη μεταλλαγών στη θέση 925 (CTG→GTG) που βρίσκεται στο τμήμα των διαμεμβρανικών καναλιών μεταφοράς ιόντων νατρίου και αποτελεί στόχο των πυρεθροειδών εντομοκτόνων. Η παρουσία ανθεκτικού αλληλόμορφου σε ομοζύγωτη κατάσταση (Εικόνα 7. β) αποτελεί δείκτη ανθεκτικότητας του εν λόγω ατόμου στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα ενώ η παρουσία του ανθεκτικού αλληλόμορφου σε ετεροζυγωτή κατάσταση (Εικόνα 7. γ) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ανάπτυξης ανθεκτικότητας στο μέλλον και συνιστά ένα πολύ σημαντικό διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση ανθεκτικότητας του *Varroa destructor* στα εν λόγω ακαρεοκτόνα.



Εικόνα 3.5. Χρωματογράφημα αλληλουχιών νουκλεοτιδίων α) του ευαίσθητου αλληλόμορφου (L925, CTG) αριστερά, β) του ανθεκτικού αλληλόμορφου (L925V, GTG) στο κέντρο και γ) του ετεροζυγωτού αλληλόμορφου (L925L/V, CTG/GTG) στα δεξιά (Alissandrakis et al. 2016)

3.4 Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα διακρίθηκαν σε επίπεδο χωρικής ανάλυσης, επομένως σε πρώτη φάση θα αναλυθούν τα δεδομένα που αποκτήθηκαν από διάφορες περιοχές της Ελλάδας και στη δεύτερη φάση θα αναλυθούν τα δεδομένα από περιοχές του β. Βελγίου.

3.4.1 Παρακολούθηση της παρουσίας και συχνότητας εμφάνισης γνωστών μεταλλαγών ανθεκτικότητας σε πληθυσμούς Βαρρόα από την Ελλάδα

Πραγματοποιήσαμε καταγραφή του ιστορικού χρήσης ακαρεοκτόνων σε 15 πληθυσμούς *Varroa* από περιοχές της Ελλάδας και έγινε διερεύνηση της παρουσίας υποκαταστάσεων στη θέση 925 του VGSC (αρίθμηση σύμφωνα με *Musca domestica* VGSC) , Πίνακας 3.3 και 3.4 κατ' αντιστοιχία. Συνολικά εξετάστηκαν 14 δείγματα από μελισσοκομεία της Ελλάδας και επιπρόσθετα εξετάστηκε δείγμα από τον ευαίσθητο πληθυσμό αναφοράς AUA-S. Πιο συγκεκριμένα, αναλύσαμε με αλληλούχιση προϊόντων PCR από μεμονωμένα δείγματα ακάρεων, μέρος του τομέα II (IIS4-IIS5) του γονιδίου VGSC.

Πίνακας 3.3. Δειγματοληπτικές περιοχές *Varroa* και ιστορικό επεμβάσεων με ακαρεοκτόνα

Πληθυσμοί	Τοποθεσίες	Ημερομηνία δειγματοληψίας	Αριθμός επεμβάσεων (5 έτη)
VD1	Athens (AUA-S)	05/2019	-
VD2	Agios Stefanos	07/2019	OA (7x), F (1x), A (1x) FA (1x)
VD3	Andros (AN-CR)	05/2019	C (10x)
VD4	Andros#2	10/2019	A (7x), OA (3x)
VD5	Euboea	04/2020	OA (10x)
VD6	Kalamata	03/2021	A (10x)
VD7	Korinthos	03/2020	A (10x)
VD8	Mani	10/2020	OA (7x), A (3x)
VD9	Metsovo	07/2019	A (6x) , F (4x)
VD10	Molaoi	10/2019	A (5x), OA (5x)
VD11	Patra	05/2020	A (7x) , OA (3x)
VD12	Sparti	08/2019	A (5x), C (3x), F (2x)
VD13	Tripoli	04/2020	A (10x)
VD14	Volos	04/2020	A (4x), OA (2x), F (3x), C (1x)
VD15	Votanikos	05/2020	A (8x), OA (2x)

C: Coumaphos; A: Amitraz; F: Flumethrin; OA: Oxalic Acid; FA: Formic Acid

Η παρακολούθηση της παρουσίας και της συχνότητας των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή έγινε κατά τα έτη 2019 έως 2021. Οι καταγεγραμμένες μέσες συχνότητες γονότυπου παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.6. Κατά τη διάρκεια της εργασίας, αναλύθηκαν 283 ακάρεα *Varroa* από 15 πληθυσμούς, για αντικατάσταση αλληλόμορφων ανθεκτικότητας. Η μεταλλαγή L925V ήταν η πιο συχνή που ανιχνεύθηκε, καθώς εντοπίστηκε σε 9 από τα 15 δείγματα (60,0%), και σε 4 από τα 9 δείγματα (44,4%) η συχνότητα της μεταλλαγής L925V αντιπροσώπευε περισσότερο από το 20% των ακάρεων στο δείγμα. Ο πληθυσμός «VD11-Patra» έδειξε την υψηλότερη συχνότητα αλληλόμορφων ανθεκτικότητας (35%) με 6 από τα 17 ακάρεα σε ομόζυγη κατάσταση L925V. Παράλληλα, 4 πληθυσμοί από τους 17 πληθυσμούς (23,5%) παρουσίασαν ετεροζύγωτη κατάσταση με V και L στη θέση 925, όμως σε χαμηλή συχνότητα $\leq 10\%$ επί των ακάρεων σε κάθε δείγμα. Η μεταλλαγή L925I εντοπίστηκε σε 8 από τα 15 δείγματα (53,3%), και σε 4 από τα 8 δείγματα (50,0%) η συχνότητα της μεταλλαγής L925I

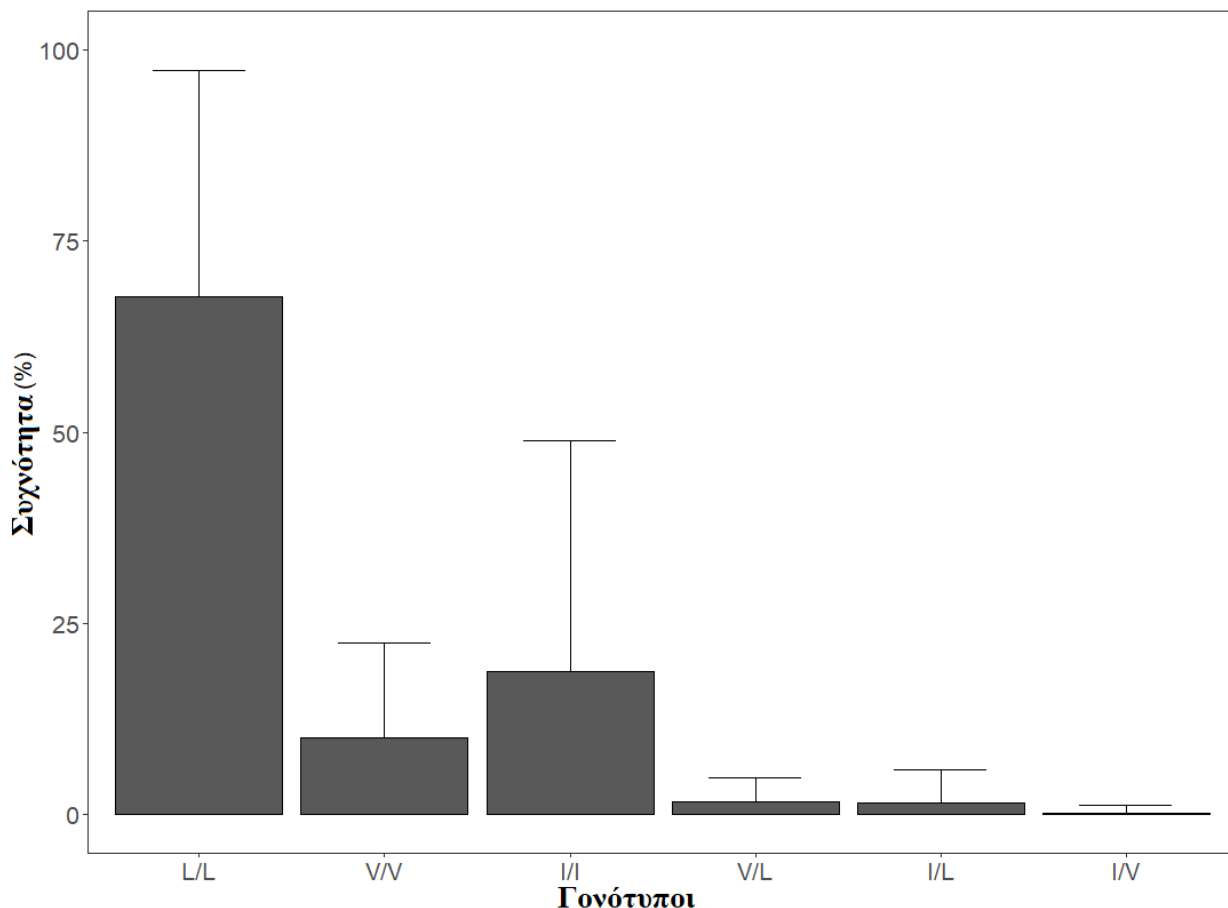
αντιπροσώπευε περισσότερο από το 20% των ακάρεων στο δείγμα. Η μεταλλαγή L925I, παρουσίασε τη μέγιστη συχνότητα εμφάνισης επί του συνόλου των αναλυθέντων ακάρεων, όπως αυτό αποτυπώνεται στον Πίνακα 6. Ο πληθυσμός «VD12-Sparti» έδειξε την υψηλότερη συχνότητα αλληλόμορφων ανθεκτικότητας (100%) με το σύνολο των ακάρεων σε ομόζυγη κατάσταση L925I. Εμφανίστηκε μόνο ένα ετεροζυγωτικό άκαρι με I και V και μόλις 5 με I και L από τα 263 που αναλύθηκαν, (0,3%) και (1,9%) κατ' αντιστοιχία. Καμία μεταλλαγή δεν ανιχνεύθηκε στον ευαίσθητο πληθυσμό (AUA-S), που διατηρείται χωρίς χημική επέμβαση τα τελευταία 20 χρόνια (Πίνακας 3.4).

Πίνακας 3.4. Καταγεγραμμένη συχνότητας γονοτύπησης (%) στη θέση 925 στο κανάλι μεταφοράς ιόντων νατρίου (σε διπλοειδή θηλυκά άτομα)

Πληθυσμοί	Τοποθεσίες	N ^a	Γονοτύπηση στη θέση 925 ^b						Ποσοστό γονοτύπησης (%)		
			I/I	V/V	I/V	I/L	V/L	L/L	I/I	V/V	L/L
VD1	Athens (AUA-S)	20	-	-	-	-	-	20	-	-	100
VD2	Agios Stefanos	20	-	5	-	-	2	13	-	30	70
VD3	Andros (AN-CR)	22	-	-	-	3	-	19	7	-	93
VD4	Andros#2	18	3	2	-	-	-	13	17	11	72
VD5	Euboea	20	-	-	-	-	-	20	-	-	100
VD6	Kalamata	23	7	2	-	-	1	13	30	11	59
VD7	Korinthos	16	-	4	-	-	-	12	-	25	75
VD8	Mani	20	6	-	-	-	-	14	30	-	70
VD9	Metsovo	18	-	5	-	-	-	13	-	28	72
VD10	Molaoi	15	-	-	-	-	-	15	-	-	100
VD11	Patra	17	3	6	-	-	-	8	18	35	47
VD12	Sparti	15	15	-	-	-	-	-	100	-	-
VD13	Tripoli	15	-	2	-	-	1	12	-	17	83
VD14	Volos	19	14	1	-	2	-	2	79	5	16
VD15	Votanikos	25	3	-	1	-	1	20	14	4	82

^a Αριθμός ακάρεων που αναλύθηκαν

^b X/X υποδηλώνει το συνδυασμό αμινοξέων που εντοπίστηκαν στα διπλοειδή θηλυκά ακάρεα (L, Λευκίνη; V, Βαλίνη; I, Ισολευκίνη). Οι ετεροζύγωτοι γονότυποι L/I και V/I δεν εντοπίστηκαν



Εικόνα 3.6. Μέση συχνότητα γονοτύπων (+ τυπική απόκλιση) στη θέση 925 του καναλιού ιόντων νατρίου σε δείγματα Βαρρόα που συλλέχθηκαν το διάστημα 2019-2021 στην Ελλάδα. Χ/Χ υποδηλώνει στο συνδυασμό αμινοξέων σε διπλοειδή θηλυκά ακάρεια (L, Λευκίνη; V, Βαλίνη; I, Ισολευκίνη). (Το διάγραμμα δημιουργήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα ggplot2)

3.4.2 Παρακολούθηση της παρουσίας και συχνότητας εμφάνισης γνωστών μεταλλαγών ανθεκτικότητας σε πληθυσμούς Βαρρόα από το Βέλγιο

Διερευνήσαμε την παρουσία υποκαταστάσεων στη θέση 925 του VGSC (αρίθμηση σύμφωνα με *Musca domestica* VGSC) σε πληθυσμούς *Varroa* από το βόρειο Βέλγιο και τοποθετήσαμε αυτές τις πληροφορίες στο ιστορικό χρήσης πυρεθροειδών (αναφέρθηκαν από τους μελισσοκόμους που έδωσαν δείγματα *Varroa* το 2019) (Πίνακας 3.5). Συνολικά εξετάστηκαν 63 δείγματα από μελισσοκομεία. Πιο συγκεκριμένα, αναλύσαμε με αλληλούχιση προϊόντων PCR από μεμονωμένα δείγματα ακάρεων, μέρος του τομέα II (IIS4-IIS5) του γονιδίου VGSC.

Πίνακας 3.5. Τοποθεσίες δειγματοληψιών *Varroa destructor*, ιστορικό εφαρμογών χρήσης πυρεθροειδών και καταγεγραμμένη συχνότητα γονοτύπησης (%) στη θέση 925 στο κανάλι μεταφοράς ιόντων νατρίου (σε διπλοειδή θηλυκά άτομα)

Τοποθεσίες δειγματοληψίας	Χρήση πυρεθροειδών ^a				Ποσοστό γονοτύπησης (%) ^b										
	2016	2017	2018	2019	2017					2019					
					N ^c	L/L	V/V	I/I	L/V	N	L/L	V/V	I/I	L/V	
Astene			○	○							20	100	-	-	-
Beselare	○	○	○	○	15	100	-	-	-		15	100	-	-	-
Brasschaat	○	○	○	○	19	10	74	-	16		24	13	79	-	8
Brugge	○	○	○	○							15	100	-	-	-
De Klinge	○	○	○	○							15	100	-	-	-
Dendermonde	○	○	○	○							15	100	-	-	-
Dentergem	○	○	○	○							15	100	-	-	-
Destelbergen (DE-FS) ^d	○	○	○	○	19	95	-	-	5		15	100	-	-	-
Eeklo			○	○	15	100	-	-	-		15	100	-	-	-
Galmaarden	○	○	●	○							20	70	20	-	10
Gent	○	○	○	○	15	93	7	-	-		15	87	13	-	-
Hechtel-Eksel 1	○	○	○		15	100	-	-	-		15	93	7	-	-
Hechtel-Eksel 2	○	○	○	○							15	80	20	-	-
Heverlee		●	●	●							20	15	75	-	10
Kalken	○	○	○	○							15	100	-	-	-
Kessel-lo	○	○	○								15	100	-	-	-
Koersel	○	○	○	○							15	100	-	-	-
Mariakerke	○	○	○	○	20	95	-	-	5		15	100	-	-	-
Opwijk											15	93	7	-	-
Retie											15	100	-	-	-
Roesbrugge	○	○	●	●							15	93	7	-	-
Sint-Truiden	●	●		●	15	100	-	-	-		15	100	-	-	-
Tongeren	○	○	○	○							15	80	-	-	20
Velzeke-Ruddershove	○	○	○	○							15	100	-	-	-
Watervliet	○	○	○	○							15	100	-	-	-
Wijnegem	●	●	●	●							15	100	-	-	-
Wilrijk	○	○	○	○							15	87	-	-	13
Wortegem-Petegem (WP-F)	○	●	●	○							20	5	95	-	-
Zaffelare											15	100	-	-	-
Zutendaal	○	○	○	○							15	100	-	-	-
Zwevegem	○	○	○	○							15	80	-	-	20
Aalst					15	100	-	-	-						
Antwerpen					20	15	75	10	-						
Boekhoute					15	100	-	-	-						
Ertvelde					15	100	-	-	-						
Helchteren					16	94	-	-	6						
Herent					16	100	-	-	-						
Heusden-Zolder					15	93	7	-	-						
Ingelmunster 1					21	-	95	-	5						
Ingelmunster 2					15	93	-	-	7						
Kessel					15	100	-	-	-						
Laarne					15	100	-	-	-						
Maldegem					15	100	-	-	-						

Merelbeke	15	93	-	-	7
Merendree	15	93	-	-	7
Moorslede	28	68	14	-	18
Mullem	16	100	-	-	-
Oeselgem	15	93	-	-	7
Ophasselt	15	100	-	-	-
Oudenaarde	16	94	6	-	-
Tessenderlo	15	100	-	-	-
Turnhout	16	100	-	-	-
Wachtebeke	15	100	-	-	-
Zelee	15	100	-	-	-
Zutendaal	16	100	-	-	-

^a Χρήση πυρεθροειδών ανά χρονιά: ναι (●), όχι (○) or άγνωστο ()

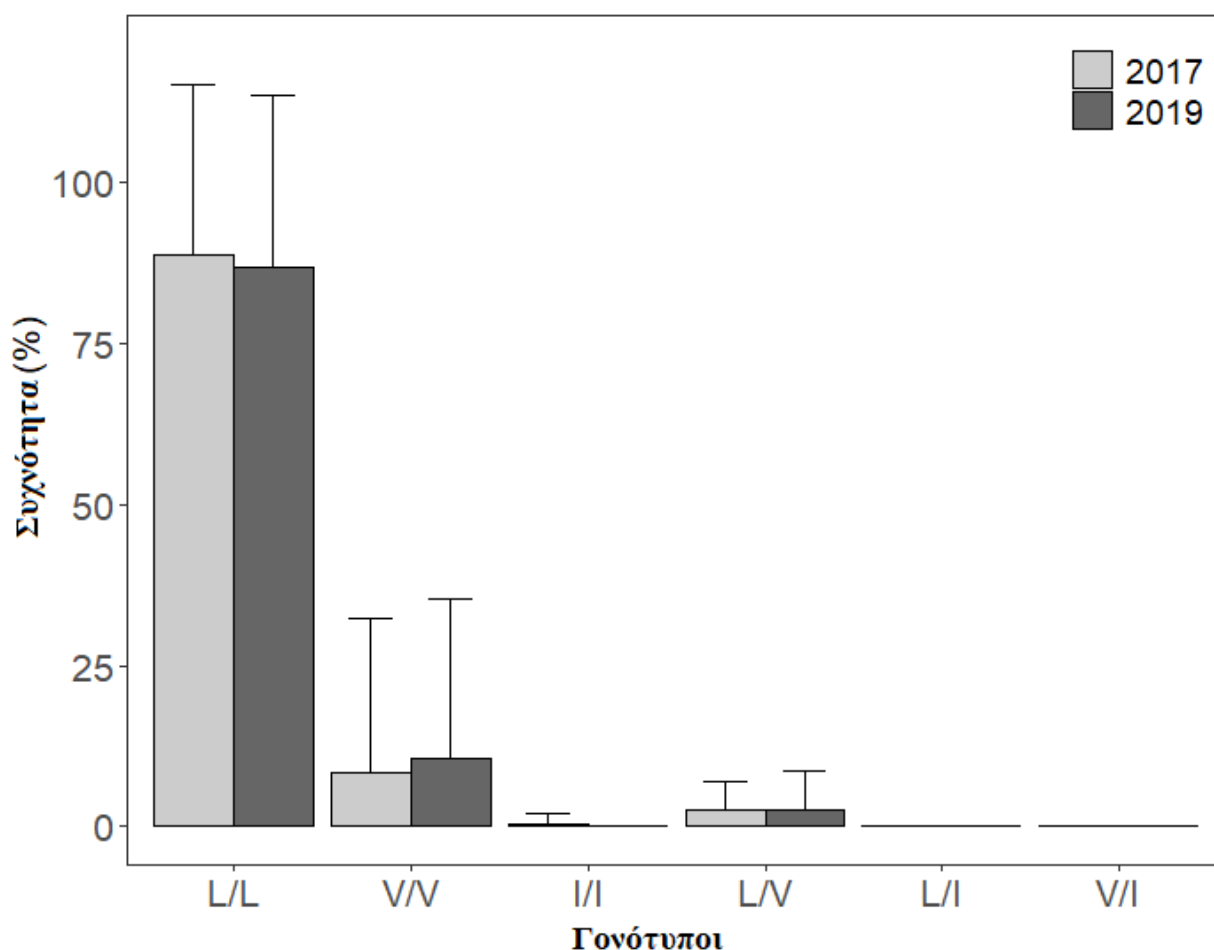
^b Χ/Χ υποδηλώνει το συνδυασμό αμινοξέων που εντοπίστηκαν στα διπλοειδή θηλυκά ακάρεα (L, Λευκίνη; V, Βαλίνη; I, Ισολευκίνη). Οι ετεροζύγωτοι γονότυποι L/I και V/I δεν εντοπίστηκαν

^c Αριθμός ακάρεων που αναλύθηκαν

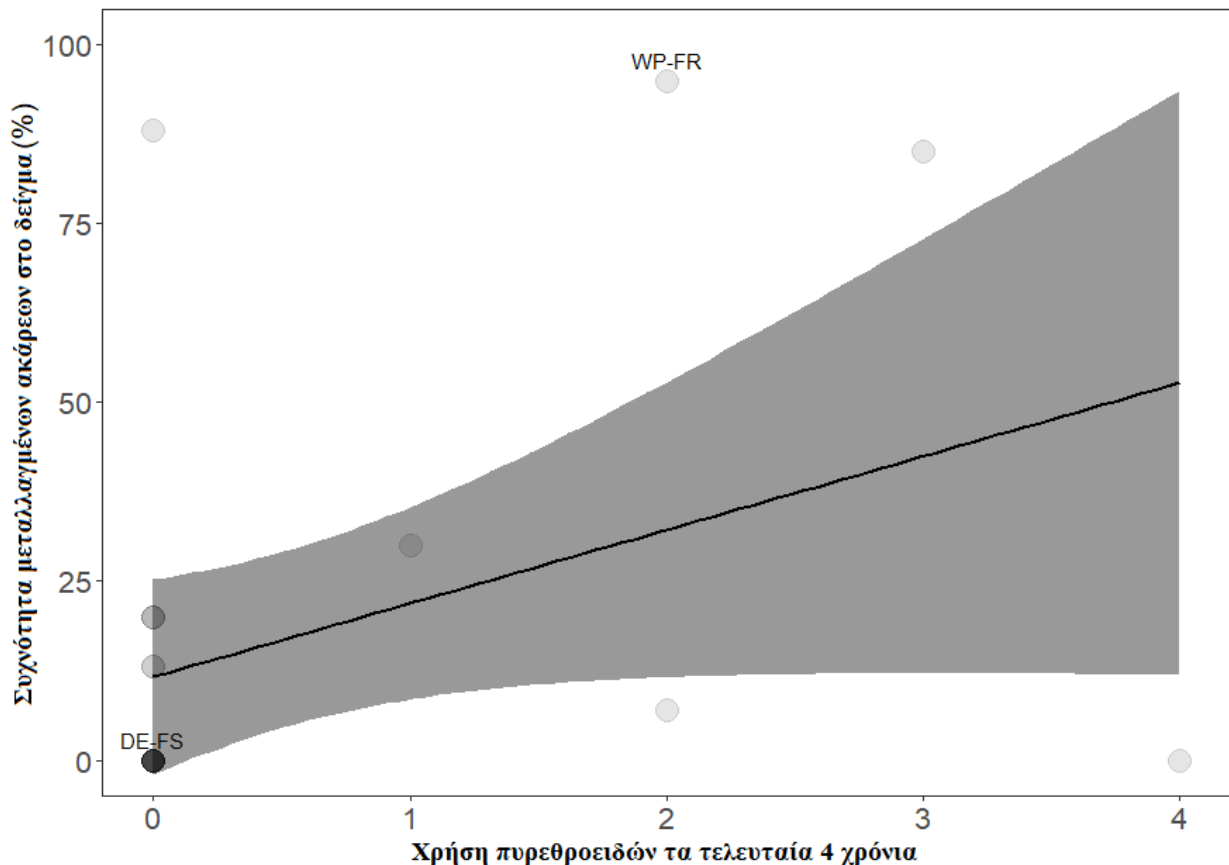
^d Πληθυσμοί που χρησιμοποιήθηκαν για βιοδοκιμές δόσης-απόκρισης στο flumethrin

Η παρακολούθηση της παρουσίας και της συχνότητας των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή χωρίστηκε σε δύο μελισσοκομικές περιόδους (2017 και 2019). Οι καταγεγραμμένες μέσες συχνότητες γονότυπου παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.7, ενώ η συχνότητα μεταλλαγμένων ακάρεων στο δείγμα σε συνάρτηση με το ιστορικό χρήσης πυρεθροειδούς φαίνεται στην Εικόνα 3.8. Δεν ανιχνεύθηκε συσχέτιση μεταξύ των δύο παραμέτρων ($R = 0.34$, $p = 0.065$). Κατά τη διάρκεια του 2017, αναλύθηκαν 523 ακάρεα *Varroa* από 32 πληθυσμούς, ενώ κατά τη διάρκεια του 2019, 494 ακάρεα από 31 πληθυσμούς εξετάστηκαν για αντικατάσταση αλληλόμορφων ανθεκτικότητας. Η μεταλλαγή L925V ήταν η πιο συχνή που ανιχνεύθηκε το 2017, καθώς εντοπίστηκε σε 14 από τα 32 δείγματα (43,7%), αλλά μόνο σε 4 από τα 32 δείγματα (12,5%) η συχνότητα της μεταλλαγής L925V αντιπροσώπευε περισσότερο από το 20% των ακάρεων στο δείγμα (Πίνακας 3.5). Ο πληθυσμός «Ingelmunster 2» έδειξε την υψηλότερη συχνότητα αλληλόμορφων ανθεκτικότητας (98%) με 20 από τα 21 ακάρεα σε ομόζυγη κατάσταση L925V και μόνο ένα ακάρεα σε ετερόζυγη κατάσταση της ίδιας μετάλλαξης. Επιπλέον, η μεταλλαγή L925I ήταν παρούσα σε ένα από τα 32 δείγματα (3%) (πληθυσμός «Antwerpen 1») σε ομόζυγη κατάσταση και βρέθηκε σε χαμηλή συχνότητα (2 στα 20 ακάρεα που εξετάστηκαν ή 10%) σε αυτόν τον πληθυσμό. Κατά τη δεύτερη σεζόν (2019), 494 ακάρεα *Varroa* από 31 πληθυσμούς αναλύθηκαν για μεταλλαγές ανθεκτικότητας. Το L925V ήταν και πάλι η πιο συχνή μεταλλαγή,

καθώς βρέθηκε σε 12 από τα 31 δείγματα (38,7%) αλλά μόνο 5 στα 31 δείγματα έδειξαν συχνότητα αλληλόμορφων ανθεκτικότητας άνω του 20%. Η μεταλλαγή L925I δεν βρέθηκε κατά τη διάρκεια αυτής της δεύτερης περιόδου δειγματοληψίας. Ο πληθυσμός «Wortegem-Petegem» έδειξε τη μεγαλύτερη συχνότητα ανθεκτικότητας αλληλόμορφων (95%) όλων των δειγμάτων με 19 στα 20 ακάρεα σε ομόζυγο κατάσταση L925V. Αυτός ο πληθυσμός επιλέχθηκε ως εκ τούτου, για τις βιοδοκιμές δόσης-απόκρισης. Επιπλέον, ως ευαίσθητος πληθυσμός αναφοράς επιλέχθηκε ένας πληθυσμός («Destelbergen») από μελισσοκόμο που δεν είχε χρησιμοποιήσει ποτέ συμβατικά ακαρεοκτόνα και χωρίς καταγεγραμμένες μεταλλάξεις ανθεκτικότητας. Ετεροζυγωτικά ακάρεα με I και V ή I και L στη θέση 925 δεν ανιχνεύθηκαν στην παρούσα μελέτη.



Εικόνα 3.7. Μέση συχνότητα γονοτύπων (+ τυπική απόκλιση) στη θέση 925 του καναλιού ιόντων νατρίου σε δείγματα Βαρρόα που συλλέχθηκαν το 2017 και το 2019 στη Φλάνδρα. X/X υποδηλώνει στο συνδυασμό αμινοξέων σε διπλοειδή θηλυκά ακάρεα (L, Λευκίνη; V, Βαλίνη; I, Ισολευκίνη). (Το διάγραμμα δημιουργήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα ggplot2)



Εικόνα 3.8. Συσχέτιση της συχνότητας μεταλλαγμένων ακάρεων στο δείγμα (η συχνότητα των ακάρεων που δεν βρίσκονταν σε ευαίσθητη ομοζυγωτία, στη θέση 925 του VGSC) και του ιστορικού χρήσης πυρεθροειδών (ο αριθμός των ετών κατά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν πυρεθροειδή ακαρεοκτόνα κατά τη διάρκεια των τελευταίων 4 ετών). Η σκίαση υποδηλώνει επικάλυψη δεδομένων. Οι δυο πληθυσμοί που χρησιμοποιήθηκαν για βιοδοκιμές, DE-FS και WP-FR, έχουν ταυτοποιηθεί. Εμφανίζεται και η γραμμική παλινδρόμηση με διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Δεν εμφανίστηκε συσχέτιση μεταξύ των παραμέτρων ($R=0.38$, $p=0.07$). (Το διάγραμμα δημιουργήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα ggplot2)

3.4.3 Απόκριση πληθυσμών Βαρρόα, με και χωρίς τη μεταλλαγή L925V, στο Flumethrin

Δύο πληθυσμοί Βαρρόα επιλέχθηκαν με βάση το προφίλ τους ως προς τη παρουσία μεταλλαγών L925V και εξετάστηκε η *in vivo* ευαισθησία στη δ.ο Flumethrin. Το LC_{50} του πληθυσμού Destelbergen (Destelbergen Flumethrin Susceptible, DE-FS) ορίστηκε σε 0.32 ng/cm^2 επιφάνειας vial, ενώ το LC_{50} του πληθυσμού Wortegem-Petegem (Wortegem-Petegem Flumethrin Resistant, WP-FR), στον οποίο υπήρχε σταθερή παρουσία της μεταλλαγής, ορίστηκε σε 4.04 ng/cm^2 επιφάνειας vial. Ως εκ τούτου, ο συντελεστής ανθεκτικότητας (Resistance Ratio, RR) είναι 12.64 φορές (Πίνακας 3.6).

Πίνακας 3.6. Αποτελέσματα θνησιμότητας ακάρεων *Varroa destructor* μέσω βιοδοκιμών στο *Flumethrin*.

Πληθυσμοί	N ^a	LC ₅₀ ^b (95% CI)	Slope (± SE)	X ^{2c}	Df	RR ₅₀ (95% CI)
DE-FS	177	0.32 (0.21 – 0.46)	1.79 (0.28)	19.7	18	-
WP-FR	202	4.04 (1.94 – 9.33)	1.20 (0.16)	44.2	18	12.64 (7.35 - 21.74)

^a αριθμός ακάρεων που εξετάστηκαν

^b LC, θανατηφόρα συγκέντρωση εκφρασμένη σε mg/l

^c Chi-square testing linearity

RR, συντελεστής ανθεκτικότητας: LC_{WP-FR} / LC_{DE-FS}

CI, διάστημα εμπιστοσύνης

3.5 Συζήτηση

Όπως πολλοί μελισσοκόμοι σε όλο τον κόσμο, έτσι στο Βέλγιο και την Ελλάδα πρέπει να λάβουν μέτρα ελέγχου κατά του *V. destructor*. Αν και έχουν αναφερθεί πληθυσμοί μελισσών που μπορούν να διατηρηθούν ή να περιορίσουν τη προσβολή από *Varroa* (Roberts et al. 2020), οι περισσότερες αποικίες μελισσών μπορούν να καταστραφούν μέσα σε λίγα χρόνια εάν ο πληθυσμός του εκτοπαρασιτικού ακάρεος δεν αντιμετωπιστεί σωστά (Francis et al. 2013). Μία από τις επιλογές που έχουν οι μελισσοκόμοι είναι η εφαρμογή επιλεκτικών ακαρεοκτόνων εντός της κυψέλης, όπως τα πυρεθροειδή που είναι και τα πιο δημοφιλή (Floris et al. 2001). Αυτά τα φωτοσταθερά παράγωγα φυσικών ενώσεων πυρέθρου από άνθη χρυσάνθεμου (O'Reilly et al. 2013) στοχεύουν σε μια πρωτεΐνη των ασπόνδυλων που είναι απαραίτητη για την έναρξη και τη διάδοση του δυναμικού δράσης σε νευρώνες και άλλα διεγέρσιμα κύτταρα: το κανάλι μεταφοράς ιόντων νατρίου (VGSC) (Dong et al. 2014). Τα πυρεθροειδή εκτός από ισχυρά εντομοκτόνα είναι και ακαρεοκτόνα. Η εκλεκτικότητα των πυρεθροειδών όπως το Flumethrin και το tau-fluvalinate έναντι των ακάρεων *Varroa*, σε αντίθεση με τις μέλισσες, πηγάζει από την εξειδικευμένη πρόσδεση τους με τον υποδοχέα.

Στη Ελλάδα και το Βέλγιο, από τις αρχές της δεκαετίας του 1990 χρησιμοποιούνται προϊόντα που περιέχουν πυρεθροειδή για την καταπολέμηση του βαρρόα,

συμπεριλαμβανομένων των εμποτισμένων ταινιών, με δραστική ουσία tau-fluvalinate και flumethrin, εντός της κυψέλης. Αν και τα πυρεθροειδή τα τελευταία χρόνια φαίνεται να έχουν χάσει μέρος της δημοτικότητάς τους, αυτές οι ουσίες εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται και να είναι διαθέσιμες στο εμπόριο μέσω του Bayvarol® (Bayer) και Apistan® (Vita-Europe). Η πιο πρόσφατη προσθήκη είναι το προϊόν PolyVar Yellow® (Bayer), μια διάτρητη ταινία εμποτισμένη με φλουμεθρίνη που τοποθετείται έξω από την είσοδο της κυψέλης και χρησιμεύει ως «περιοριστής εισόδου». Όταν οι μέλισσες εισέρχονται ή εξέρχονται από την κυψέλη μέσω των διόδων των ταινιών, εφαρμόζεται μια μικρή δόση ακαρεοκτόνου. Το προϊόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη της επαναμόλυνσης των μελισσοσμηνών από το άκαρι Βαρρόα. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε την πολύ υψηλή αποτελεσματικότητα του PolyVar® Yellow (99,9%) σε σύγκριση με μια επαναληπτική θεραπεία με coumaphos (Perizin). Η σημασία του PolyVar® Yellow συνοδεύτηκε επίσης από την αύξηση των ποσοστών επιβίωσης στις υπό θεραπεία κυψέλες, καταδεικνύοντας την έμμεση σημασία μιας αποτελεσματικής θεραπείας με *Varroa* για την υγεία των αποικιών (Blacquièrre et al. 2017). Ωστόσο, η επιτυχία αυτής της καινοτόμου τεχνικής εξαρτάται από την ανθεκτικότητα των ακάρεων *Varroa*. Ένας από τους στόχους της παρούσας μελέτης ήταν η παρακολούθηση γνωστών μεταλλάξεων στα σημεία στόχους των πυρεθροειδών που θα μπορούσαν να θέσουν σε κίνδυνο αυτή την προσέγγιση και να ελέγξει εάν οι μεταλλάξεις επηρεάζουν την ευαισθησία στο Flumethrin, δεδομένου ότι υπάρχουν λίγες πληροφορίες σχετικά με την επίδραση των μεταλλάξεων στην ευαισθησία αυτής της ένωσης, καθώς υπάρχουν αναφορές μόνο για το tau-fluvalinate (González-Cabrera et al. 2013, 2016; Hubert et al. 2014; Stara et al. 2019).

Όπως συμβαίνει συνήθως από τη συχνή και εντατική χρήση των φυτοφαρμάκων, οι πληθυσμοί *Varroa* έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή. Η ανθεκτικότητα αυτή έχει αποδοθεί σε μεταλλάξεις στη θέση στόχου, σε συγκεκριμένες θέσεις του VGSC. Αυτές οι υποκαταστάσεις αμινοξέων μειώνουν την ικανότητα δέσμευσης των πυρεθροειδών στο κανάλι, μειώνοντας έτσι την τοξική τους δράση. Η σύνδεση μεταξύ μεταλλάξεων στο VGSC και ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή περιγράφηκε πρώτη φορά στην οικιακή μύγα *M. domestica*, όπου η μετάλλαξη L1014F είναι γνωστή ως μετάλλαξη kdr (knockdown resistance) (González-Cabrera et al. 2016; Williamson et al. 1993). Επιπλέον μεταλλάξεις που συνδέονται με την ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή έχουν έκτοτε περιγραφεί στο ίδιο είδος: L1014H (kdr-his) και ο συνδυασμός L1014F + M918T (super-kdr), οδήγησε σε ακόμη ισχυρότερη ανθεκτικότητα (Liu

& Pridgeon 2002; Williamson et al. 1993). Για λόγους ευκολίας, αυτές οι μεταλλαγές αναφέρονται ως μεταλλάξεις τύπου kdr (Rinkevich et al. 2013). Μετά τη πρώτη αναφορά στην οικιακή μύγα, ακολούθησαν αναφορές μεταλλάξεων τύπου kdr σε πολλά άλλα αρθρόποδα, συμπεριλαμβανομένων των ακάρεων *Tetranychus urticae*, *T. evansi*, *Panonychus citri* και *Sarcoptes scabiei* (Dong et al. 2014; Feyereisen et al. 2015). Ένα εκτοπαρασιτικό μέλος Acari που προστέθηκε πρόσφατα σε αυτόν τον κατάλογο είναι το *Dermanyssus gallinae*, γνωστό ως άκαρι των πουλερικών (Katsanou et al. 2020). Στη περίπτωση του *Varroa*, η πρώτη συσχέτιση μεταξύ ανθεκτικότητας στο tau-fluvalinate και μιας μετάλλαξης στη θέση στόχου στο VGSC, έγινε από τους González-Cabrera et al. 2013 και Hubert et al. 2014. Συγκεκριμένα, η μεταλλαγή L925V (αρίθμηση βάση *M. domestica*) βρέθηκε να υπάρχει σε όλα τα ακάρεα *Varroa* που επέζησαν μετά από επέμβαση με tau-fluvalinate (Aristan®). Αυτή η θέση L925 πλέον αναφέρεται ως μεταλλαγή που προκαλεί ανθεκτικότητα, εντός της θέσης πρόσδεσης των πυρεθροειδών στο VGSC (González-Cabrera et al. 2013). Στην Ελλάδα η πρώτη αναφορά εμφάνισης μεταλλαγών ανθεκτικότητας του *V. destructor* στα πυρεθροειδή έγινε από Alissandrakis et al. (2016, 2017) ενώ στο Βέλγιο δεν είχε πραγματοποιηθεί αντίστοιχη μελέτη.

Στην παρούσα μελέτη, δείγματα *Varroa* που προέρχονται από μελισσοκομεία σε Φλάνδρα (Βέλγιο) και Ελλάδα, εξετάστηκαν για την παρουσία μεταλλαγών στη θέση 925 στο τμήμα IIS5 στα κανάλια μεταφοράς ιόντων νατρίου. Στο Βέλγιο, περισσότερα από 59% των δείγματα *Varroa* αποτελούνταν από δείγματα που έφεραν μόνο το ευαίσθητο αλληλόμορφο (L/L925). Τα αλληλόμορφα γονίδια ανθεκτικότητας που υπάρχουν στο 40% περίπου των πληθυσμών που εξετάστηκαν, δείχνει ότι ο έλεγχος της βαρροϊκής ακαρίασης θα γινόταν σύντομα ανεπαρκής εάν οι μελισσοκόμοι βασίζονταν μόνο στα πυρεθροειδή. Ωστόσο, με βάση το ερωτηματολόγιό μας, φαίνεται ότι οι περισσότεροι από τους ερωτηθέντες Φλαμανδούς μελισσοκόμους απέχουν από τη χρήση πυρεθροειδών και εφαρμόζουν οργανικά οξέα ή θυμόλη. Ο γονότυπος L925I ανιχνεύθηκε σε έναν μόνο πληθυσμό.

Αντίστοιχα, στην Ελλάδα μόνο το 20% των δειγμάτων αποτελούνταν από *Varroa* που έφεραν μόνο το ευαίσθητο αλληλόμορφο (L/L925). Τα αλληλόμορφα ανθεκτικότητας που εντοπίζονται στο 80% των πληθυσμών που αναλύθηκαν, φανερώνει υψηλή επικινδυνότητα για την αντιμετώπιση της βαρροϊκής ακαρίασης με χρήση πυρεθροειδών ακαρεοκτόνων. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης της μεταλλαγής L925V σε σύγκριση με τη μεταλλαγή L925I με ποσοστά εμφάνισης επί των δειγμάτων 60% και 53,3% αντίστοιχα. Εντυπωσιακή χαρακτηρίζεται η υψηλή παρουσία ανθεκτικών αλληλόμορφων σε

πληθυσμούς που είχαν δεχθεί ελάχιστες ή και καμία επέμβαση με πυρεθροειδή ακαρεοκτόνα, τα τελευταία 5 έτη. Ενώ για πρώτη φορά καταγράφηκε πληθυσμός με συχνότητα του ανθεκτικού αλληλόμορφου L925I ίση με 100% επί των αναλυμένων ακάρεων. Μέχρι τώρα, η μεταλλαγή L925I είχε καταγραφεί σε ακάρεα από τις Η.Π.Α (González-Cabrera et al. 2016; Millán-Leiva et al. 2021b), την Ελλάδα (Alissandrakis et al. 2017; Millán-Leiva et al. 2021b) και τη γειτονική Τουρκία (Koc et al. 2021). Αυτή η μεταλλαγή λευκίνης σε ισολευκίνη (L925I) φαίνεται να δημιουργείται μέσω της ενδιάμεσης μετατροπής σε μεθειονίνη (L925M) (L [CTG] → M [ATG] → I [ATA]) (Millán-Leiva et al. 2021a). Είναι ενδιαφέρον, ότι η μεταλλαγή L925I φαίνεται να εμπλέκεται στην ανθεκτικότητα των πυρεθροειδών σε κρότνες, κοριούς και whiteflies (Rinkevich et al. 2013).

Κατά τη διάρκεια της έρευνας, δεν είχε δημοσιευτεί μια μελέτη που αναφέρει πιθανή εμπλοκή της μεταλλαγής M918L με ανθεκτικότητα των ακάρεων *Varroa* στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα. Επιπρόσθετα, ο πρόσθιος εκκινήτης μας (Vd_kdr_F1) ήταν ακριβώς έξω από αυτήν την περιοχή, με αποτέλεσμα ο προσδιορισμός της υποκατάστασης σε αυτή τη θέση να μην είναι δυνατός στις περισσότερες περιπτώσεις.

Για τη διερεύνηση της συμμετοχής των μεταλλαγών L925 στην ευαισθησία και την ανθεκτικότητα στη φλουμεθρίνη, πραγματοποιήθηκαν πλήρης βιοδοκιμές δόσης-απόκρισης σε πληθυσμό *Varroa* (Wortegem-Petegem, WP-FR) με άτομα που έφεραν την μεταλλαγή L925V σε πολύ υψηλή συχνότητα, έναντι πληθυσμού *Varroa* (Destelbergen, DE-FS) που αποτελούταν από ευαίσθητα άτομα που έφεραν τον γονότυπο L925. Και οι δύο πληθυσμοί βρέθηκαν να διαθέτουν μεθειονίνη (M918) ως εκ τούτου δεν παρατηρήθηκε μεταλλαγή στη θέση 918 που να προσδίδει ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή. Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών έδειξαν πως για τον πληθυσμό WP-FR, χρειάστηκε 12,6 × περισσότερη φλουμεθρίνη για την εξάλειψη του 50% των ακάρεων (RR50) χρησιμοποιώντας εμποτισμένα με το εντομοκτόνο φιαλίδια, σε σχέση με τον ευαίσθητο πληθυσμό DE-FS (Πίνακας 3.6). Το αποτέλεσμα των βιοδοκιμών είναι συγκρίσιμο με το 13 φορές υψηλότερο LC50 σε ένα ανθεκτικό έναντι ενός ευαίσθητου στελέχους, με άγνωστους γονότυπους, που αναφέρεται από τους Thomson et al. (2002). Ως εκ τούτου, εντοπίσαμε ανθεκτικότητα στη φλουμεθρίνη σε πληθυσμό Βαρρόα από το Wortegem-Petegem (WP-FR) που προέρχονται από έναν μελισσοκόμο που ανέφερε τη χρήση του PolyVar® Yellow το 2017 και το 2019. Αυτή η πρόσφατη εφαρμογή πυρεθροειδών και επομένως η πίεση επιλογής μπορεί να εξηγήσει τη

σχεδόν σταθεροποίηση της μεταλλαγής ανθεκτικότητας (95% των ακάρεων είναι ομόζυγα V/V).

Αν και η εμπλοκή άλλων μηχανισμών ανθεκτικότητας, όπως η αυξημένη δράση ενζύμων αποτοξικοποίησης, δεν μπορεί να αποκλειστεί, τα ευρήματά μας υποδηλώνουν ότι η μετάλλαξη L925V επηρεάζει την τοξικότητα της φλουμεθρίνης και αυτό μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα θεραπευτικών επεμβάσεων για το *Varroa destructor* με πυρεθροειδή ακαρεοκτόνα. Αυτό είναι σημαντικό καθώς η μακροχρόνια χρήση πυρεθροειδών έχει προφανώς οδηγήσει σε επιλογή για τις μεταλλάξεις στη θέση στόχου, και παρόλο που υπάρχουν κυρίως σε χαμηλή συχνότητα, η παρατεταμένη χρήση μπορεί να οδηγήσει γρήγορα σε σταθεροποίηση των μεταλλαγών.

Μια γενική συσχέτιση μεταξύ του (αναφερόμενου) ιστορικού χρήσης πυρεθροειδών και της παρουσίας μεταλλαγών L925 δεν μπόρεσε να ανακαλυφθεί στην παρούσα μελέτη (Εικ. 10). Προφανώς, οι εφαρμογές πυρεθροειδών δεν θα αυξήσουν το ποσοστό των ανθεκτικών γονότυπων εάν δεν υπάρχουν τέτοια δείγματα εξαρχής. Επίσης, τα μελισσοκομεία και οι μεμονωμένοι πληθυσμοί μελισσών δεν είναι ένα κλειστό σύστημα. Πράγματι, η δυναμική του πληθυσμού επηρεάζεται από μια μόνιμη ανταλλαγή ακάρεων *Varroa* (Rosenkranz et al. 2010). Αν και η μετάδοση των ακάρεων μπορεί να συμβεί έμμεσα μέσω ουδέτερων τοποθεσιών, όπως τα λουλούδια, οι περισσότερες μεταδόσεις συμβαίνουν απευθείας, μέσω της εισόδου παρασιτισμένων μελισσών σε ξένη κυψέλη (Peck & Seeley 2019). Αυτό μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια λεηλασίας από εργάτριες μέλισσες και παραπλάνησης από κηφήνες ή εργάτριες μέλισσες. Κατά τη διάρκεια της παραπλάνησης, οι μέλισσες εγκαταλείπουν μια αποικία και ενσωματώνονται με μια άλλη, κάτι που επιτρέπει τη μονόπλευρη μετάδοση των ακάρεων, ενώ η λεηλασία, δηλαδή η εισβολή μελισσών σε μια άλλη κυψέλη για να κλέψουν το αποθηκευμένο μέλι, επιτρέπει την αμφίδρομη μετάδοση (Fries & Camazine 2001). Ομοίως, οι νέες αποικίες μελισσών, που προμηθεύονται οι μελισσοκόμοι για την αντιστάθμιση των απωλειών του χειμώνα, μπορεί επίσης να εισάγει ξένους γονότυπους ακάρεων στα μελισσοκομεία, ενώ η μεταφορά αποικιών, π.χ. για σκοπούς επικονίασης, ενισχύει τις πιθανότητες αλληλεπιδράσεων με ξένους γονότυπους.

Συχνά η ανθεκτικότητα συνδέεται με κάποια απώλεια εύρωστης λειτουργίας του οργανισμού (fitness cost), που οδηγεί σε μείωση της συχνότητας των ανθεκτικών αλληλόμορφων, τη λεγόμενη 'αναστροφή' (Thomson et al. 2002). Ως εκ τούτου, θα μπορούσε κανείς να αναμένει ότι η συχνότητα των ανθεκτικών ακάρεων θα μειωθεί σταδιακά μόλις

διακοπεί η χρήση των πυρεθροειδών στον έλεγχο της *Varroa*. Η μέθοδος αυτή έχει πράγματι προταθεί από τους González-Cabrera et al. (2018), ενώ στην Ιταλία έχει αναφερθεί ‘αναστροφή’ της ανθεκτικότητας στο fluralinate περίπου 50% ετησίως (Thomson et al. 2002). Οι Milani & Vedova (2002) καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι τα σημαντικά αποτελέσματα της ‘αναστροφής’ πρέπει να αναμένονται μόνο μετά από πολλές γενιές. Η έλλειψη συσχέτισης, στην παρούσα μελέτη, μεταξύ της ανίχνευσης της υποκατάστασης L925V σε πληθυσμούς *Varroa* και του ιστορικού χρήσης πυρεθροειδών, μπορεί επίσης να είναι συνέπεια αυτού του μάλλον αργού ρυθμού ‘αναστροφής’. Παρομοίως, οι Milani & Vedova (2002) προτείνουν τη χρήση πυρεθροειδών μόνο κάθε 4-6 χρόνια, αλλά να ακολουθείται αμέσως από μια εναλλακτική θεραπεία για τη μείωση του αριθμού και της εξάπλωσης των ανθεκτικών ακάρεων.

Καθώς πραγματοποιήσαμε αλληλούχισή μεμονωμένων ακάρεων *Varroa*, έγινε μια ακριβής εκτίμηση των συχνοτήτων των αλληλόμορφων σε κάθε πληθυσμό, ενώ προσδιορίστηκε η ομο- ή ετερόζυγη κατάσταση σε κάθε άκαρι. Είναι σαφές ότι η πλειονότητα των αλληλόμορφων ανθεκτικότητας L925V βρισκόταν σε ομόζυγα ακάρεα (Εικόνες 3.6,3.7), κάτι που αναφέρθηκε επίσης από τους González-Cabrera et al. (2018). Αυτό μπορεί να είναι συνέπεια τόσο της εντελώς υπολειπόμενης φύσης της μεταλλαγής (González-Cabrera et al. 2018; Sever et al. 2020) όσο και του συστήματος αναπαραγωγής του ακάρεως. Πράγματι, με βάση την *in vitro* μελέτη των καναλιών μεταφοράς ιόντων νατρίου σε νευρώνες αρουραίων (Song et al. 1996; Tatebayashi & Narahashi 1994), η αναστολή μόνο ενός μικρού κλάσματος των VGSC ήταν αρκετή για να διαταράξει την επαναπόλωση των νευρώνων. Ομοίως, σε ετερόζυγα θηλυκά ακάρεα με ένα ανθεκτικό και ένα ευαίσθητο αντίγραφο, τα μισά από τα VGSC στο σώμα ενός ακάρεως θα ήταν ευάλωτα στα πυρεθροειδή, με αποτέλεσμα τη θνησιμότητα. Αυτό αναφέρεται επίσης από τους González-Cabrera et al. (2018), καθώς η επιβίωση των ετεροζυγωτικών (L/V925) ακάρεων δεν διέφερε σημαντικά από την επιβίωση των ακάρεων με ομόζυγο γονότυπο άγριου τύπου (L/L) μετά από *in vitro* θεραπεία με φλουμεθρίνη, ενώ η επιβίωση και των δύο ομάδων ήταν σημαντικά χαμηλότερη από τα ομόζυγα ανθεκτικά (V/V) ακάρεα. Επιπλέον, η *Varroa* έχει απλο-διπλοειδή προσδιορισμό φύλου και ο κύκλος ζωής της χαρακτηρίζεται από ζευγάρωμα μεταξύ αδελφών, αφού συνήθως ένα γονιμοποιημένο θηλυκό εισβάλλει μέσα σε ένα κελί γόνου μέλισσας για να αναπαραχθεί. Μετά το σφράγισμα του κελιού, το γονιμοποιημένο θηλυκό εναποθέτει πρώτα ένα απλοειδή αυγό. Το αρσενικό που θα εκκολαφθεί, θα ζευγαρώσει με τις αδερφές του που

προέρχονται από τα διπλοειδή αυγά που γεννήθηκαν στη συνέχεια (Traynor et al. 2020). Ενώ η αιμομιξία από μόνη της είναι γνωστό ότι αυξάνει την ομοζυγωτία σε βάρος της ετεροζυγωτίας, η καταγραφή ελάχιστων ετερόζυγων ακάρεων *Varroa* (για τη θέση VGSC 925) μπορεί επίσης να είναι συνέπεια του ότι τα μεταλλαγμένα ακάρια που έχουν επιβιώσει των θεραπειών με πυρεθροειδή είναι γενικά ομόζυγα. Ως εκ τούτου, οι ετερόζυγοι απόγονοι δημιουργούνται σπάνια καθώς τα ανθεκτικά ακάρια γενικά δεν έχουν την ευκαιρία να ζευγαρώσουν με ευαίσθητα άτομα. Σύμφωνα με τους Beaurepaire et al. (2017), ωστόσο, το ζευγάρωμα μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων ακάρεων, μπορεί να είναι πιο συνηθισμένο όσο προχωράει η μελισσοκομική περίοδος και απομακρυνόμαστε από τη τελευταία θεραπεία. Η αναλογία του μεγέθους του πληθυσμού των ακάρεων σε σχέση με τον αριθμό των διαθέσιμων κελιών γόνου μελισσών αυξάνεται στη συνέχεια, αυξάνοντας τις πιθανότητες των θηλυκών *Varroa* να συν-μολύνουν ένα κελί, επιτρέποντας το ζευγάρωμα μη αδελφών. Τέλος, αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι σε ένα απλοειδές-διπλοειδές σύστημα προσδιορισμού φύλου, τα ημιζυγωτά αρσενικά εκτίθενται πλήρως στην επιλογή, και έτσι τα ανθεκτικά άτομα δυνητικά εξαπλώνονται ταχύτερα στον πληθυσμό (Carrière 2003; Havron et al. 1987).

Κεφάλαιο 4. Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας του Amitraz σε πληθυσμούς Βαρρόα από διάφορες περιοχές της Ελλάδας καθώς και σε ανθεκτικούς πληθυσμούς σε άλλα ακαρεοκτόνα.

4.1 Περίληψη

Για τον έλεγχο του Βαρρόα, οι μελισσοκόμοι εκτός από το οργανοφωσφορικό Coumaphos και τα πυρεθροειδή tau-fluvalinate και flumethrin, χρησιμοποιούν εντατικά το προεντομοκτόνο Amitraz, το οποίο ανήκει στην κατηγορία των φορμαμιδινών. Στη παρούσα μελέτη, μελετήθηκε η διερεύνηση ανθεκτικότητας πληθυσμών Βαρρόα, από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, στο Amitraz, με χρήση εργαστηριακών διαγνωστικών βιοδοκιμών επαφής. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε μοριακή ανάλυση, στοχευμένων δειγμάτων, του β-αδρενεργικού υποδοχέα οκτοπαμίνης (β-adrenergic receptor (βAOR)) για παρουσία πολυμορφισμών που έχουν συσχετιστεί με ανθεκτικότητα στη δ.ο του Amitraz (Hernández-Rodríguez et al. 2021). Τα αποτελέσματα των εργαστηριακών διαγνωστικών βιοδοκιμών επαφής έναντι ανθεκτικών πληθυσμών Βαρρόα, σε άλλα ακαρεοκτόνα, καθιστούν τη δ.ο Amitraz ως πιθανό μέσο διαχείρισης της ανθεκτικότητας του Βαρρόα στο Coumaphos (OP) και στα πυρεθροειδή tau-fluvalinate και flumethrin.

4.2 Εισαγωγή

Το προεντομοκτόνο Amitraz, ανήκει στην κατηγορία των φορμαμιδινών και αποτελεί το μοναδικό εγκεκριμένο ακαρεοκτόνο έναντι του *Varroa*, αυτής της οικογένειας, για χρήση στη μελισσοκομία. Η εκλεκτική του δράση έναντι του παρασίτου, χωρίς τη πρόκληση προβλημάτων στις μέλισσες, έχει ως αποτέλεσμα τη χρήση του από τους μελισσοκόμους. Έχοντας ως στόχο τους υποδοχείς οκταπαμίνης (adrenergic octopamine receptors – AOR), ο μοναδικός αναφερόμενος μηχανισμός ανθεκτικότητας του Βαρρόα στο Amitraz είναι σημειακές μεταλλάξεις στο β-αδρενεργικό υποδοχέα οκτοπαμίνης (βAOR).

Το ακαρεοκτόνο Amitraz χρησιμοποιείται στη μελισσοκομία παγκοσμίως για την καταπολέμηση του *Varroa*, όμως η παρατεταμένη και εκτεταμένη χρήση του έχει ως αποτέλεσμα την αναφορά περιστατικών ανθεκτικότητας, σε διάφορες περιοχές του κόσμου.

Επομένως, η πραγματοποίηση διαγνωστικών εφαρμογών (in vivo και in vitro) μας δίνει σημαντικά δεδομένα για τη παρακολούθηση του φαινομένου της ανθεκτικότητας στην Ελλάδα, όπου δεν υπάρχουν αναφορές ανθεκτικότητας στο *Amitraz* προς το παρόν.

Στο κεφάλαιο αυτό θα μελετηθεί η αποτελεσματικότητα του *Amitraz* έναντι πληθυσμών από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, καθώς και σε ανθεκτικούς πληθυσμούς σε άλλα ακαρεοκτόνα όπως τα πυρεθροειδή και το *Coumaphos*. Παράλληλα θα μελετηθεί και η πιθανή ανάπτυξη ανθεκτικότητας, αναλύοντας τη παρουσία μεταλλαγών στον β-αδρενεργικό υποδοχέα, που αποτελεί το σημειακό στόχο του *Amitraz*, σε πληθυσμούς Βαρρόα με βεβαρημένο ιστορικό επεμβάσεων με *Amitraz*.

4.3 Υλικά και Μέθοδοι

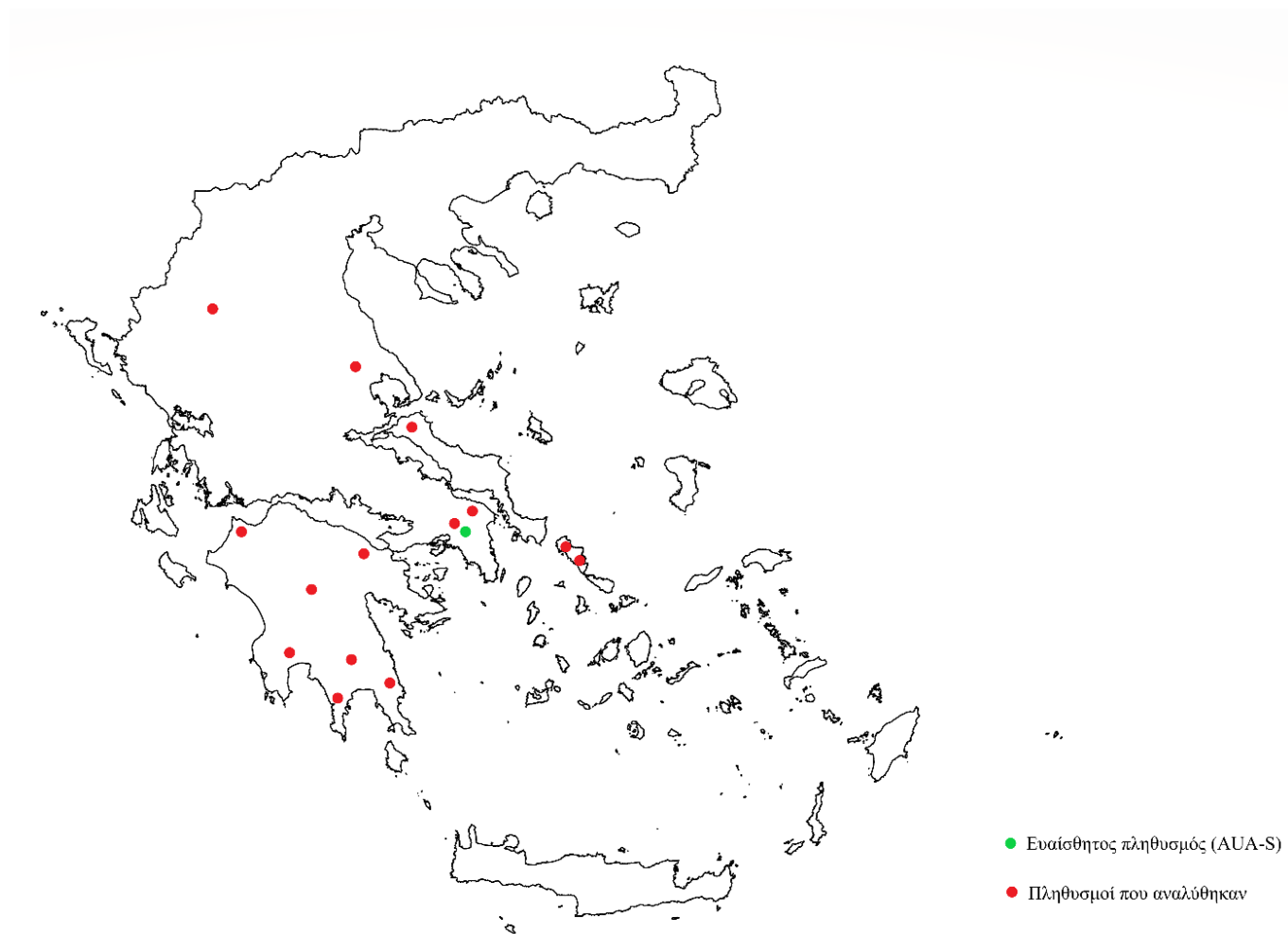
4.3.1 Βιολογικό υλικό

Η ανάλυση ανθεκτικότητας του *Varroa* στο *Amitraz* έγινε με διαγνωστικές βιοδοκιμές πληθυσμών από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Παράλληλα πραγματοποιήθηκαν μοριακές αναλύσεις πληθυσμών με βεβαρημένο ιστορικό χρήσης της δ.ο *Amitraz*. Ως βιολογικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν αποκλειστικά ενήλικα θηλυκά άτομα Βαρρόα.

4.3.2 Πληθυσμοί *Varroa* από περιοχές της Ελλάδας

Συλλέχθηκαν δεκατέσσερις πληθυσμοί Βαρρόα από διάφορες περιοχές της χώρας κατά τα έτη 2019 έως 2021 (Εικόνα 4.1). Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε από μελισσοκόμους που διατηρούσαν τουλάχιστον 20 κυψέλες μελισσών και συνοδεύτηκε από αποστολή τουλάχιστον 2 πλαισίων με σφραγισμένο γόνο στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, ενώ πραγματοποιήθηκε καταγραφή του ιστορικού θεραπευτικών επεμβάσεων των μελισσοκόμων για τη βαρροϊκή ακαρίαση. Επίσης συλλέχθηκε ένας ακόμα πληθυσμός από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών και χαρακτηρίστηκε ως ευαίσθητος καθότι είχε διατηρηθεί χωρίς χημική καταπολέμηση τουλάχιστον για τα τελευταία 20 χρόνια (συντομογραφία ATH-S, Athens Susceptible). Η συλλογή των πληθυσμών Βαρρόα συνοδεύτηκε από ερωτηματολόγιο για το

ιστορικό εφαρμογών με ακαρεοκτόνα για τα τελευταία πέντε χρόνια από τη στιγμή της δειγματοληψίας. Συνολικά, αναλύθηκαν 112 βαρρόα για την παρουσία γνωστών μεταλλαγών ανθεκτικότητας στον β-αδρενεργικό υποδοχέα(Πίνακας 3).



Εικόνα 4.1. Χωρική απεικόνιση πληθυσμών Βαρρόα, από περιοχές της Ελλάδας, που αναλύθηκαν.

4.3.3 Συλλογή βιολογικού υλικού και βιοδοκιμές

Για τη δειγματοληψία πληθυσμών Βαρρόα από περιοχές της Ελλάδας, ακολουθήθηκε η διαδικασία όπως «2.3.2 Συλλογή βιολογικού υλικού». Η υψηλής καθαρότητας δ.ο *Amitraz* (>95% καθαρότητα, Sigma Aldrich) διαλύθηκε, με τη χρήση του οργανικού διαλύτη Ακετόνη, με στόχο τη δημιουργία διαλύματος υψηλής συγκέντρωσης (Stock Solution) και το οποίο διατηρήθηκε σε θερμοκρασία -20°C . Πριν τη πραγματοποίηση των βιοδοκιμών παρασκευάζονταν φρέσκα διαλύματα διαγνωστικής συγκέντρωσης και ποσότητα 0.5 mL διαλύματος από κάθε συγκέντρωση τοποθετούταν εντός ξεχωριστών γυάλινων φιαλιδίων (Vials) (Kimble, 60965D-3). Τα vials περιστρέφονταν ούτως ώστε να διαμοιραστεί ομοιόμορφα εντός αυτών η δ.ο. Καθώς η ακετόνη εξατμιζόταν, δημιουργήθηκε ένα λεπτό στρώμα εντομοκτόνου στην εσωτερική επιφάνεια των vials. Τα εμποτισμένα vials αφέθηκαν τουλάχιστον δύο ώρες για να στεγνώσουν, πριν χρησιμοποιηθούν για τις βιοδοκιμές.

Στη συνέχεια ομάδες των 10 ατόμων ενήλικων Βαρρόα, τοποθετήθηκαν εντός των εμποτισμένων vials και σφραγίζονταν με το ειδικό πώμα. Σε κάθε περίπτωση τα vials τοποθετήθηκαν εντός επωαστικού θαλάμου, σε συνθήκες σκότους, στους 25°C και σχετική υγρασία 60% για 20 ώρες. Μετά το πέρας των 20 ωρών, πραγματοποιούταν καταμέτρηση της θνησιμότητας των ακάρεων. Ως νεκρά χαρακτηρίζονταν τα ακάρεα τα οποία δεν μπορούσαν να περπατήσουν μετά το ελαφρύ ακούμπημα με πινέλο. Απόρροια των αποτελεσμάτων ήταν η δημιουργία καμπύλης τοξικότητας για τον ευαίσθητο πληθυσμό ATH-S. Η καμπύλη τοξικότητας του ευαίσθητου πληθυσμού συνετέλεσε στον ορισμό της διαγνωστικής δόσης, στην οποία εκτέθησαν οι προς εξέταση πληθυσμοί, με σκοπό τη διερεύνηση ύπαρξης ανθεκτικότητας στη δ.ο *Amitraz*.

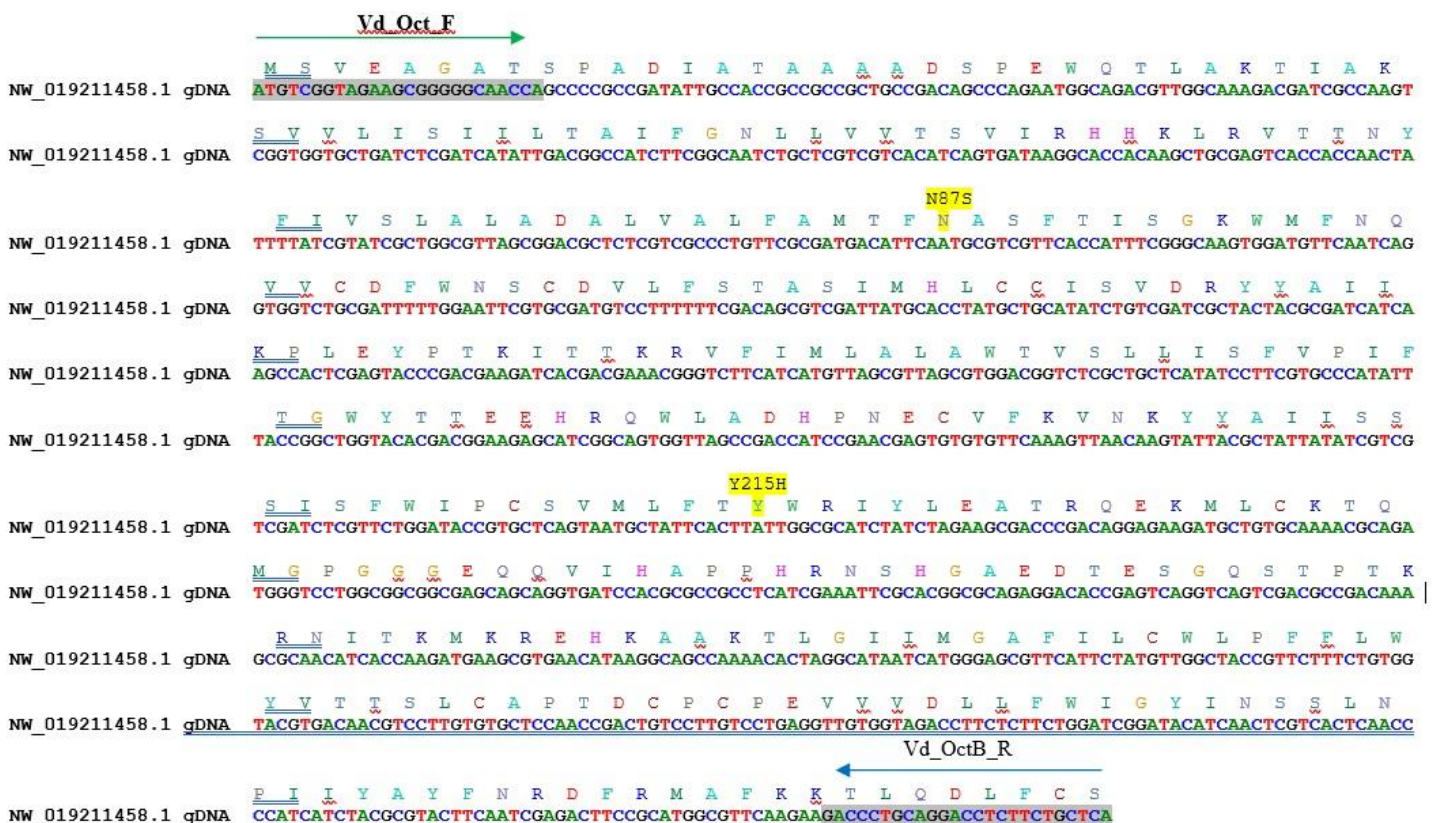
4.3.4 Απομόνωση DNA, ενίσχυση και αλληλούχιση του β-αδρενεργικού υποδοχέα.

Πραγματοποιήθηκαν μοριακά διαγνωστικά στους πληθυσμούς Βαρρόα που συλλέχθηκαν από τις περιοχές της Ελλάδας. Τα μοριακά διαγνωστικά για την ανίχνευση της ανθεκτικότητας στο προεντομοκτόνο *Amitraz*, συνοδεύτηκαν από απομόνωση γενωμικού DNA των Βαρρόα, ενίσχυση και αλληλούχιση του β-αδρενεργικού υποδοχέα, στο οποίο περιέχονται γνωστές μεταλλαγές (N87S, Y215H) που προσδίδουν την ανθεκτικότητα (Hernández-Rodríguez et al. 2021). Η πραγματοποίηση των μοριακών διαγνωστικών έγινε σύμφωνα με «4.3.4.1 Μοριακά διαγνωστικά για την ανίχνευση της ανθεκτικότητας του *Varroa*

destructor στο Amitraz». Η ανάλυση των αποτελεσμάτων αλληλούχιση έγινε με το λογισμικό BioEdit v.7.0.5.3 (Hall 1999) χρησιμοποιώντας την αλληλουχία του β-αδρενεργικού υποδοχέα οκτοπαμίνης του *Varroa destructor* (GenBank Acc. No. XP_022664702.1) ως πρότυπη για την αρίθμηση.

4.3.4.1 Μοριακά διαγνωστικά για την ανίχνευση της ανθεκτικότητας του *Varroa destructor* στο Amitraz

Το μοριακό διαγνωστικό για την ανίχνευση της ανθεκτικότητας στο Amitraz βασίστηκε στη μέθοδο PCR και σχεδιάστηκε ώστε να εντοπίζει την παρουσία ή όχι των αλληλόμορφων (N87S, Y215H) σε άτομα *Varroa destructor*. Αυτή η ανάλυση χρησιμοποιεί τους εκκινητές Vd_OctB_F και Vd_OctB_R που πλαισιώνουν τις περιοχές όπου περιέχονται οι μεταλλαγές και ενισχύει ένα τμήμα γενωμικού DNA 1074 ζεύγων βάσεων (bp) (Εικόνα 4.2).



Εικόνα 4.2. Νουκλεοτιδική αλληλουχία τμήματος από το β αδρενεργικό υποδοχέα οκτοπαμίνης που αποτελεί στόχο του Amitraz και στο οποίο περιέχονται οι μεταλλαγές N87S και Y215H

Πιο συγκεκριμένα ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

Ομογενοποίηση ενήλικων ατόμων *Varroa* και απομόνωση γενωμικού DNA

Γενωμικό DNA απομονώθηκε από μεμονωμένα ακμαία θηλυκά άτομα. Πιο συγκεκριμένα:

1. Μεμονωμένα άτομα *Varroa* ομογενοποιήθηκαν σε μείγμα (5M NaCl, 1M Tris HCl PH:8, H₂O, Πρωτεΐνάση K 10mg/ml) τελικού όγκου 52 μl, με ειδικό ομογενοποιητή που εφαρμόζει σε 1.5 ml Eppendorf tube.
2. Έγινε επώαση δείγματος για 60 λεπτά στους 55°C και ακολούθως για 5 λεπτά στους 85°C
3. Φυγοκέντρηση σε 10000×g, για 5 λεπτά και απομάκρυνση των αδιάλυτων συστατικών.
4. Μεταφορά του υπερκείμενου διαλύματος σε 1,5ml eppendorf tube. Το υπερκείμενο διάλυμα αποτελεί την πηγή του γενωμικού DNA.

PCR για την ανάκτηση και ενίσχυση τμήματος του γονιδίου στόχου.

Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της PCR με σκοπό την ανάκτηση και ενίσχυση τμήματος του γονιδίου στόχου του Amitraz (β-αδρενεργικός υποδοχέας οκτοπαμίνης), στο οποίο περιέχονται οι μεταλλαγές N87S και Y215H και η παρουσία των οποίων έχει συσχετιστεί με την ανθεκτικότητα του *Varroa* στα εντομοκτόνο Amitraz (Hernandez-Rodriguez et.al 2021).

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθοι:

Εμπρόσθιος εκκινητής (Vd_OctB_F): 5' ATGTCGGTAGAAGCGGGGCAACCA 3'

Αντίστροφος εκκινητής (Vd_OctB_R): 5' TGAGCAGAAGAGGTCCTGCAGGGTC 3'

Και για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν τα συστατικά που περιγράφονται στον Πίνακα 4.1.

Πίνακας 4.1: Συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη διενέργεια μιας αντίδρασης PCR

	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ
gDNA	2 ul
10x buffer (περιέχει. 15mM MgCl ₂)	2.5 ul
10mM dNTPs	0.5 ul
10uM Vd_OctB_F	0.5 ul
10uM Vd_OctB_R	0.5 ul
Kapa Taq	0.1ul
H ₂ O	18.9 ul
Total	25 ul

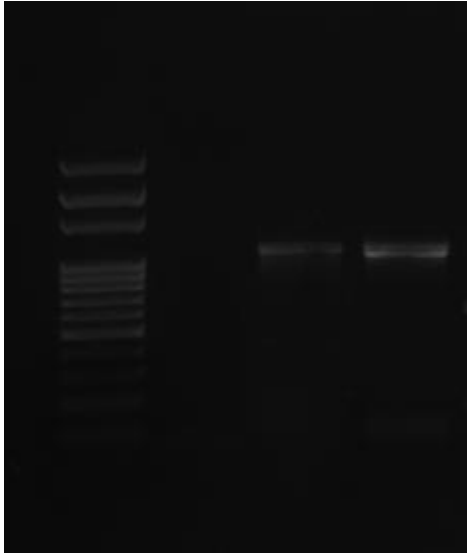
Το αναμενόμενο μέγεθος της αντίδρασης ήταν 1074bp και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε 35 κύκλους ενίσχυσης σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα (Πίνακας 4.2).

Πίνακας 4.2: Πρόγραμμα PCR για τον πολλαπλασιασμό του επιθυμητού τμήματος DNA μεγέθους 1074bp.

ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ PCR	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (°C)	ΧΡΟΝΟΣ
1. Αρχική αποδιάταξη	95	3 min
2. Αποδιάταξη	95	30 sec
3. Υβριδισμός εκκινητών	56	30 sec
4. Επιμήκυνση	72	1 min
Επανάληψη σταδίων 2-4 για 34 φορές.		
5. Τελική επιμήκυνση	72	2 min

Ηλεκτροφόρηση και καθαρισμός προϊόντων PCR

Τα προϊόντα των αντιδράσεων ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,0 % (w/v). Η ηλεκτροφόρηση είναι μια συνηθισμένη εργαστηριακή τεχνική για τον διαχωρισμό τμημάτων DNA βάσει μεγέθους φορτίου. Εντός κωνικής φιάλης διαλύθηκε 1 γρ. αγαρόζης σε 100 ml TAE 1x. Ακολούθησε θέρμανση του διαλύματος έως ότου αυτό έγινε διαυγές και στο τέλος προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 1 μg/ml. Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ειδικό εκμαγείο που έφερε προσαρμοσμένα χτένια (combs) έως ότου πήξει. Το πήκτωμα αγαρόζης μεταφέρθηκε σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TAE και ακολούθησε η τοποθέτηση των προϊόντων της PCR στις εσοχές που είχαν σχηματιστεί από τα ειδικά χτένια. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιήθηκε στα 80 V για 45 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα μεταφέρεται σε ειδική τράπεζα εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας όπου λαμβάνονται φωτογραφίες μέσω ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής. Η επιτυχής απομόνωση γενωμικού DNA και η επιτυχής αντίδραση της τεχνικής PCR μπορεί να διαπιστωθεί μέσω της παρουσίας μια ευδιάκριτης ζώνης μεγέθους 1074 bp που αντιστοιχεί στο τμήμα του β αδρενεργικού υποδοχέα, στο οποίο περιέχονται οι μεταλλάξεις N87S και Y215H (εικόνα 4.3).



Εικόνα 4.3. Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR (1074bp) από δείγματα *Varroa destructor* σε πήκτωμα αγαρόζης (1,0 % w/v).

Αλληλούχιση και αξιολόγηση αποτελεσμάτων

Το προϊόν της PCR μετά από καθαρισμό με χρήση του εμπορικού kit (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up της εταιρίας Macherey-Nagel) στάλθηκε για αλληλούχιση με τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR στην εταιρεία Macrogen (Amsterdam). Οι αλληλουχίες που αποκτήθηκαν, αναλύθηκαν με το πρόγραμμα Bioedit 7.2.5. Στα χρωματογραφήματα αποτυπώνεται η ύπαρξη ή μη μεταλλαγών στη θέση 87 (AAT→AGT) και στη θέση 215 (TAT→CAT) που βρίσκεται στο β αδρενεργικό υποδοχέα της οκτοπαμίνης και αποτελεί στόχο του εντομοκτόνου Amitraz. Η παρουσία ανθεκτικών αλληλόμορφων σε ομοζύγωτη κατάσταση αποτελεί δείκτη ανθεκτικότητας του εν λόγω ατόμου στο Amitraz ενώ η παρουσία των ανθεκτικών αλληλόμορφων σε ετεροζυγωτή κατάσταση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ανάπτυξης ανθεκτικότητας στο μέλλον και συνιστά ένα πολύ σημαντικό διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση ανθεκτικότητας του *Varroa destructor* στο εν λόγω ακαρεοκτόνο.

4.4 Αποτελέσματα

4.4.1 Ευαισθησία πληθυσμών *V. Destructor*, από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, στο Amitraz

Η διερεύνηση της ύπαρξης ανθεκτικότητας έγινε με κλασικές μεθόδους βιοδοκιμών. Μετά την έκθεση του ευαίσθητου πληθυσμού ATH-S σε ένα εύρος δόσεων Amitraz, καθορίστηκε η καμπύλη δόσης-απόκρισης αυτού. Η διαγνωστική δόση, στην οποία εξετάστηκαν οι προς διερεύνηση πληθυσμοί, ορίστηκε ως η δόση η οποία προκαλεί 99% θνησιμότητα στον ATH-S πληθυσμό πολλαπλασιασμένη επί δύο. Αυτό το μοντέλο προκύπτει από τη σύσταση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) σύμφωνα με την οποία, ως διαγνωστική δόση ορίζεται το διπλάσιο της ελάχιστης δόσης που προκαλεί συστηματικά 99% θνησιμότητα, μετά από συγκεκριμένη χρονική περίοδο, στον ευαίσθητο πληθυσμό (WHO 2018). Ως εκ τούτου, μετά από ανάλυση των αποτελεσμάτων βιοδοκιμών, η δόση Amitraz που θανατώνει το 99% του πληθυσμού ATH-S ορίζεται στα 10 mg/L και η διαγνωστική δόση, στην οποία εκτέθησαν οι προς εξέταση πληθυσμοί, ορίζεται στα 20 mg/L.

Πραγματοποιήσαμε καταγραφή του ιστορικού χρήσης ακαρεοκτόνων σε 15 πληθυσμούς *Varroa* από περιοχές της Ελλάδας (Πίνακας 4.3) και εξετάστηκαν συνολικά δεκατέσσερις πληθυσμοί Βαρρόα, ως προς την ευαισθησία τους στη δ.ο Amitraz, ύστερα από σύγκριση με τον ευαίσθητο πληθυσμό ATH-S και ο πληθυσμός VD7 από τη Κόρινθο, παρουσίασε μειωμένο ποσοστό θνησιμότητας (92%) (Πίνακας 4.4), ύστερα από βιοδοκιμή στη διαγνωστική δόση 20 mg/L. Αυτός ο πληθυσμός, σύμφωνα με τον Πίνακα 4.3 προέρχεται από δείγμα, του οποίου ο μελισσοκόμος έκανε αποκλειστική χρήση Amitraz, για τα τελευταία πέντε χρόνια. Παρόλα αυτά, δεν ανιχνεύτηκαν μεταλλαγές στο β-αδρενεργικό υποδοχέα, τον στόχο του Amitraz, ύστερα από μοριακή ανάλυση σύμφωνα με: 4.3.4.1 Μοριακά διαγνωστικά για την ανίχνευση της ανθεκτικότητας του *Varroa destructor* στο Amitraz.

Πίνακας 4.3. Δειγματοληπτικές περιοχές *Varroa* και ιστορικό επεμβάσεων με ακαρεοκτόνα

Πληθυσμοί	Τοποθεσίες	Ημερομηνία δειγματοληψίας	Αριθμός επεμβάσεων (5 έτη)
VD1	Athens (AUA-S)	05/2019	-
VD2	Agios Stefanos	07/2019	OA (7x), F (1x), A (1x) FA (1x)
VD3	Andros (AN-CR)	05/2019	C (10x)
VD4	Andros#2	10/2019	A (7x), OA (3x)
VD5	Euboea	04/2020	OA (10x)
VD6	Kalamata	03/2021	A (10x)
VD7	Korinthos	03/2020	A (10x)
VD8	Mani	10/2020	OA (7x), A (3x)
VD9	Metsovo	07/2019	A (6x) , F (4x)
VD10	Molaoi	10/2019	A (5x), OA (5x)
VD11	Patra	05/2020	A (7x) , OA (3x)
VD12	Sparti	08/2019	A (5x), C (3x), F (2x)
VD13	Tripoli	04/2020	A (10x)
VD14	Volos	04/2020	A (4x), OA (2x), F (3x), C (1x)
VD15	Votanikos	05/2020	A (8x), OA (2x)

C: coumaphos; A: Amitraz; F: tau-Fluvalinate; OA: Oxalic Acid; FA: Formic Acid

Πίνακας 4.4. Μέση ποσοστιαία θνησιμότητα πληθυσμών Βαρρόα σε δόσεις Amitraz (mg/L)

Πληθυσμοί	Περιοχές	Amitraz	N ¹	Θνησιμότητα (%)
Θανατηφόρα συγκέντρωση 99% (mg/l) (f.l.) ²				
VD1	Athens (AUA-S)	10 (6.680-18.347)	80	100
Διαγνωστική δόση (mg/l)				
VD2	Agios Stefanos	20	60	100
VD3	Andros (AN-CR)	20	60	100
VD4	Andros#2	20	60	100
VD5	Euboea	20	60	100
VD6	Kalamata	20	60	97
VD7	Korinthos	20	60	92
VD8	Mani	20	60	100

VD9	Metsovo	20	60	100
VD10	Molaoi	20	60	100
VD11	Patra	20	60	100
VD12	Sparti	20	60	100
VD13	Tripoli	20	60	100
VD14	Volos	20	60	100
VD15	Votanikos	20	60	100

¹ αριθμός ατόμων που εξετάστηκαν (N)

² fiducial limits (όρια παραβολής)

4.4.2 Παρακολούθηση της παρουσίας μεταλλαγών ανθεκτικότητας σε πληθυσμούς Βαρρόα από την Ελλάδα

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος για παρουσία μεταλλαγών ανθεκτικότητας, που έχουν συσχετιστεί με ανθεκτικότητα στο Amitraz, με διερεύνηση της παρουσίας υποκαταστάσεων στις θέσεις 87 και 215 του β-αδενεργικού υποδοχέα της οκτοπαμίνης (αρίθμηση σύμφωνα με *Varroa destructor*) (Εικόνα 4.2). Συνολικά έγινε στοχευμένη εξέταση δειγμάτων από πέντε μελισσοκομεία της Ελλάδας με βεβαρημένο ιστορικό χρήσης της δ.ο Amitraz (VD6, VD7, VD11, VD 13, VD15), από ένα μελισσοκομείο με ανθεκτικότητα στη δ.ο Coumaphos (VD3) και από ένα μελισσοκομείο με υψηλή συχνότητα εμφάνισης αλληλόμορφων που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή ακαρεοκτόνα (VD12). Επιπρόσθετα εξετάστηκε δείγμα από τον ευαίσθητο πληθυσμό αναφοράς AUA-S (VD1). Πιο συγκεκριμένα, αναλύσαμε με αλληλούχιση προϊόντων PCR από μεμονωμένα δείγματα ακάρεων, τον β-αδενεργικό υποδοχέα της οκτοπαμίνης.

Η παρακολούθηση της παρουσίας των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στο Amitraz έγινε κατά το έτος 2021. Οι καταγεγραμμένες μέσες συχνότητες γονότυπου παρουσιάζονται στον πίνακα 3. Κατά τη διάρκεια της εργασίας, αναλύθηκαν 112 ακάρεα *Varroa* από 8 πληθυσμούς, για αντικατάσταση αλληλόμορφων ανθεκτικότητας. Δεν ανιχνεύθηκε κανένα αλληλόμορφο ανθεκτικότητας επί των αναλυμένων ακάρεων (0%). Πέντε πληθυσμοί (VD6, VD7, VD11, VD 13, VD15) με υψηλή συχνότητα χρήσης της δ.ο Amitraz (50-100% επί των συνολικών επεμβάσεων) δεν εμφάνισαν αλληλόμορφα ανθεκτικότητας, στις θέσεις 87 και 215 του β-αδενεργικού υποδοχέα της οκτοπαμίνης. Παράλληλα, ο πληθυσμός Andros (VD3) που χαρακτηρίστηκε ως εξαιρετικά ανθεκτικός στη δ.ο Coumaphos (βλ.Κεφάλαιο 2) και ο πληθυσμός Sparti (VD12) που ανιχνεύθηκε το σύνολο των ακάρεων του σε ομόζυγη

κατάσταση L925I (βλ.Κεφάλαιο 3),δεν εμφάνισαν αλληλόμορφα ανθεκτικότητας στις θέσεις 87 και 215 του β-αδρενεργικού υποδοχέα της οκτοπαμίνης.

Καμία μεταλλαγή δεν ανιχνεύθηκε στον ευαίσθητο πληθυσμό (AUA-S), που διατηρείται χωρίς χημική επέμβαση τα τελευταία 20 χρόνια (Πίνακας 4.3).

Πίνακας 4.5. Καταγεγραμμένη συχνότητα γονοτύπησης (%) στις θέσεις 87 και 215 στο β-αδρενεργικό υποδοχέα της οκτοπαμίνης (σε διπλοειδή θηλυκά άτομα)

Πληθυσμοί	Τοποθεσίες	N ^a	Γονοτύπηση στη θέση 87			Ποσοστό γονοτύπησης (%)			Γονοτύπηση στη θέση 215			Ποσοστό γονοτύπησης (%)
			S/S	S/N	N/N	N/N	H/H	H/Y	Y/Y	N/N		
VD1	Athens (AUA-S)	15	-	-	15	100	-	-	15	100		
VD3	Andros (AN-CR)	15	-	-	15	100	-	-	15	100		
VD6	Kalamata	12	-	-	12	100	-	-	12	100		
VD7	Korinthos	15	-	-	15	100	-	-	15	100		
VD11	Patra	12	-	-	12	100	-	-	12	100		
VD12	Sparti	15	-	-	15	100	-	-	15	100		
VD13	Tripoli	13	-	-	13	100	-	-	13	100		
VD15	Votanikos	15	-	-	15	100	-	-	15	100		

^a Αριθμός ακάρεων που αναλύθηκαν

^b X/X υποδηλώνει το συνδυασμό αμινοξέων που εντοπίστηκαν στα διπλοειδή θηλυκά ακάρεια (S, Σερίνη; N, Ασπαραγίνη; Y, Τυροσίνη; H, Ιστιδίνη).

4.5 Συζήτηση

Το εκτοπαρασιτικό άκαρι *V. Destructor* αποτελεί τον σημαντικότερο εχθρό των μελισσών, ενώ έχει συσχετιστεί με το Σύνδρομο Κατάρρευσης των μελισσών (CCD) που προκαλεί εκτεταμένες απώλειες μελισσοσμηνών σε παγκόσμιο επίπεδο . Η αντιμετώπιση του παρασίτου με διάφορα μέσα κρίνεται απαραίτητη για την επιβίωση των αποικιών μελισσών καθώς σε αντίθετη περίπτωση αυτές καταρρέουν μέσα σε λίγα χρόνια (Francis et al. 2013). Η χρήση επιλεκτικών ακαρεοκτόνων,αποτελεί μέχρι σήμερα το πιο αποτελεσματικό μέσο για το περιορισμό του *Varroa*. Πληθώρα ακαρεοκτόνων έχουν δοκιμαστεί για την αποτελεσματικότητά τους έναντι του παρασίτου, όμως ελάχιστα από αυτά έχουν λάβει έγκριση για χρήση στη μελισσοκομία. Εκτός από το οργανοφωσφορικό προεντομοκτόνο Coumaphos, τα πυρεθροειδή

εντομοκτόνα (tau-fluvalinate, flumethrin) και το προεντομοκτόνο Amitraz χρησιμοποιείται εντατικά από τους μελισσοκόμους για την καταπολέμηση του *Varroa*. Το Amitraz ανήκει στην οικογένεια των φορμαμιδινών και είναι προεντομοκτόνο καθώς απαιτεί ενεργοποίηση για τη μετατροπή του στον μεταβολίτη N2-(2,4-Dimethylphenyl)-N1-methylformidine (DPMF) που δρα ως ανταγωνιστής των υποδοχέων οκτοπαμίνης (Kita et al. 2016).

Στην Ελλάδα, από τις αρχές της δεκαετίας του 1990 χρησιμοποιούνται προϊόντα που περιέχουν Amitraz για τη καταπολέμηση του βαρρόα, χωρίς ωστόσο να έχουν έγκριση για χρήση στη μελισσοκομία. Μόλις τα τελευταία χρόνια, το σκεύασμα Aritraz, εμποτισμένες ταινίες με Amitraz που τοποθετούνται ανάμεσα στο γόνο των μελισσών, εγκρίθηκε για χρήση στη μελισσοκομία. Η υψηλή αποτελεσματικότητα που χαρακτηρίζει τις επεμβάσεις με Amitraz, σε συνδυασμό με την προγενέστερη εμφάνιση φαινομένων ανθεκτικότητας στις δ.ο Coumaphos (Κεφάλαιο 2) και tau-fluvalinate, flumethrin (Κεφάλαιο 3) είχε ως αποτέλεσμα την εκτεταμένη και επαναλαμβανόμενη χρήση του Amitraz από τη πλειοψηφία των μελισσοκόμων της χώρας, γεγονός που αποτυπώνεται και από το καταγεγραμμένο ιστορικό επεμβάσεων σε τυχαίο δείγμα μελισσοκόμων.

Στην παρούσα μελέτη, δείγματα *Varroa* που προέρχονται από μελισσοκομεία της Ελλάδας, διερευνήθηκαν ως προς την ευαισθησία τους στη δ.ο Amitraz. Ύστερα από χρήση κλασικών μεθόδων βιοδοκιμών, προέκυψε ότι οι πληθυσμοί VD6 και VD7, παρουσίασαν μειωμένη ευαισθησία στη διαγνωστική δόση 20mg/L με θνησιμότητα 97% και 92% κατ'αντιστοιχία. Σύμφωνα με τη καταγραφή του ιστορικού θεραπευτικών επεμβάσεων για τα τελευταία πέντε έτη, διαπιστώθηκε πως η δ.ο Amitraz αποτελούσε το αποκλειστικό μέσο καταπολέμησης του παρασίτου από τους μελισσοκόμους. Στους υπόλοιπους πληθυσμούς που εξετάστηκαν, δεν παρατηρήθηκε μειωμένη απόκριση στη διαγνωστική δόση.

Η πρόσφατη δημοσίευση από Hernández-Rodríguez et al. (2021) στην οποία περιγράφεται η συσχέτιση σημειακών μεταλλαγών στις θέσεις 87 και 215 του β-αδενεργικού υποδοχέα οκτοπαμίνης (βAOR) και ανθεκτικότητας στο Amitraz, αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την διάγνωση και παρακολούθηση των αλληλόμορφων που προσδίδουν ανθεκτικότητα των ακάρεων Βαρρόα στην εν λόγω δραστική ουσία. Κατά τη διάρκεια της διατριβής, αναλύθηκαν 112 ακάρεα *Varroa* από 8 πληθυσμούς με υψηλή καταγεγραμμένη συχνότητα χρήσης της δ.ο Amitraz, για αντικατάσταση αλληλόμορφων ανθεκτικότητας. Δεν ανιχνεύθηκε γνωστή μεταλλαγή επί των αναλυμένων ακάρεων (0%). Ως εκ τούτου, δε μπορεί να αποκλειστεί η εμπλοκή άλλων μηχανισμών ανθεκτικότητας, όπως ενζύμων

αποτοξικοποίησης ή παρεμπόδισης της ενεργοποίησης του προεντομοκτόνου Amitraz, στη μειωμένη ευαισθησία των πληθυσμών VD12 και VD13.

Παράλληλα, ο πληθυσμός Andros (VD3) που χαρακτηρίστηκε ως εξαιρετικά ανθεκτικός στη δ.ο Coumaphos (βλ.Κεφάλαιο 2) δεν εμφάνισε μειωμένη απόκριση στη διαγνωστική δόση, ύστερα από έκθεση μέσω βιοδοκιμών επαφής. Παράλληλα, το μοριακό διαγνωστικό που εφαρμόστηκε σε άτομα αυτού του πληθυσμού, δεν εντόπισε αλληλόμορφα ανθεκτικότητας στις θέσεις 87 και 215 του βΑOR. Επιπρόσθετα, ο πληθυσμός Sparti (VD12) που ανιχνεύθηκε το σύνολο των ακάρεων του σε ομόζυγη κατάσταση I925V και χαρακτηρίζεται ως ανθεκτικός στα πυρεθροειδή ακαρεοκτόνα, παρουσίασε ευαισθησία στη διαγνωστική δόση με θανάτωση όλων των ακάρεων που εκτέθηκαν σε αυτή. Παρομοίως, ύστερα από τη μοριακή ανάλυση των ακάρεων αυτού του πληθυσμού, δεν παρουσιάστηκε διαφοροποίηση σε σύγκριση με τον ευαίσθητο πληθυσμό αναφοράς AUA (VD1). Συμπερασματικά, δεν εντοπίζεται διασταυρωτή ανθεκτικότητα σε ανθεκτικούς πληθυσμούς σε άλλα ακαρεοκτόνα (coumaphos, tau-fluvalinate, flumethrin) και στο Amitraz. Η μη ύπαρξη διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ αυτών των δραστικών ουσιών, αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο των μελισσοκόμων για τη διαχείριση της βαρροϊκής ακαρίασης, θεσπίζοντας το Amitraz ως πιθανό μέσο διαχείρισης της ανθεκτικότητας του Βαρρόα στο Coumaphos (OP) και στα πυρεθροειδή tau-fluvalinate και flumethrin.

Κεφάλαιο 5. Αξιολόγηση βιοεντομοκτόνων φυσικής προέλευσης ως προς την δράση τους έναντι του *Varroa destructor*.

5.1 Περίληψη

Ο παρασιτισμός των μελισσών από το άκαρι *Varroa destructor* αποτελεί το μεγαλύτερο πρόβλημα της σύγχρονης μελισσοκομίας. Οι μελισσοκόμοι για να το περιορίσουν προβαίνουν κυρίως σε συχνές επεμβάσεις με εκλεκτικά χημικά ακαρεοκτόνα που χαρακτηρίζονται από χαμηλή τοξικότητα για τις μέλισσες. Όμως η συχνή και εκτεταμένη χρήση χημικών ακαρεοκτόνων έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση περιστατικών ανθεκτικότητας στο σύνολο των δραστικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στη συμβατική μελισσοκομία. Εξετάστηκε η χρήση εντομοκτόνων φυσικής προέλευσης (βιοεντομοκτόνα) έναντι του Βαρρόα και αξιολογήθηκε η δράση τους έναντι ανθεκτικών πληθυσμών σε άλλα ακαρεοκτόνα. Η αποτελεσματικότητα της δράσης των βιοεντομοκτόνων έναντι του βαρρόα, ήταν αποτέλεσμα της χρήσης μεθόδων βιοδοκιμών. Στη συνέχεια μελετήθηκε η συνεργιστική δράση των επιλεγμένων βιοεντομοκτόνων, με μικρή ποσότητα του πυρεθροειδούς εντομοκτόνου Flumethrin, χωρίς ωστόσο να αποδειχθεί κάποια στατιστική σημαντική συνέργεια. Τέλος, αξιολογήθηκε η μελισσοτοξική δράση των βιοεντομοκτόνων. Με χρήση βιοδοκιμών επαφής οξείας τοξικότητας επιβεβαιώθηκε η εκλεκτική δράση των ουσιών αυτών έναντι των μελισσών.

5.2 Εισαγωγή

Η μεταπήδηση του Βαρρόα από την Ασιατική μέλισσα (*Apis cerana*) στην Ευρωπαϊκή μέλισσα (*Apis mellifera*) πριν από μερικές δεκαετίες, συνοδεύτηκε από μεγάλες απώλειες μελισσοσμηνών και τους μελισσοκόμους να προσπαθούν εναγωνίως να περιορίσουν αυτό το τόσο σημαντικό εχθρό (Locke 2016; Rosenkranz et al. 2010). Για την καταπολέμηση του *Varroa* χρησιμοποιήθηκαν πολλές δραστικές ουσίες συνοδευόμενες με πληθώρα επεμβατικών μεθόδων. Τα καλύτερα αποτελέσματα έναντι του παρασίτου, εμφάνισαν τα συνθετικά χημικά σκευάσματα (Rosenkranz et al. 2010). Ωστόσο, η μειωμένη δυνατότητα εναλλαγής δραστικών ουσιών είχε ως αποτέλεσμα την επαναλαμβανόμενη και εκτεταμένη χρήση σκευασμάτων που περιείχαν τις προαναφερθείσες δ.ο. Η χρήση των συνθετικών

χημικών ουσιών συνοδεύτηκε από εμφάνιση περιστατικών ανθεκτικότητας σε διάφορες περιοχές του κόσμου, επιβάρυνση των προϊόντων της μέλισσας και του περιβάλλοντος από υπολείμματα φαρμάκων καθώς και δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία των μελισσών και των χρηστών-καταναλωτών (González-Cabrera et al. 2016; Hernández-Rodríguez et al. 2021; Millán-Leiva, Marín, De la Rúa, et al. 2021; Vlogiannitis et al. 2021). Ως εκ τούτων, αναπτύχθηκαν ανησυχίες για την χρήση αυτών των ουσιών στα πλαίσια της βιώσιμης γεωργίας. Η ανάπτυξη και χρήση εντομοκτόνων ουσιών φυσικής προέλευσης (green chemicals), φιλικών προς τις μέλισσες ενώ ταυτόχρονα θα διατηρούν την εκλεκτικής τους δράση έναντι του Βαρρόα, κρίνεται πιο επιτακτική από ποτέ.

Τα βιοεντομοκτόνα αποτελούν εντομοκτόνα φυσικής προέλευσης (βακτήρια, μύκητες ή φυτικά εκχυλίσματα) που χρησιμοποιούνται για την εκλεκτική καταπολέμηση εντόμων ή παρασίτων (Tijjani et al. 2016). Είναι προϊόντα ή παραπροϊόντα που προέρχονται από ζώα, έντομα, μέρη φυτών ή φυτικά εκχυλίσματα και μικροοργανισμούς (Pavela 2014). Παρότι υπάρχει απόκλιση από τον ορισμό, αυτά τα φυσικά προϊόντα μπορούν να θεωρηθούν ως χημικά εντομοκτόνα, εφόσον έχουν αντίκτυπο στο νευρικό σύστημα του εχθρού (Marrone 2019). Επιπρόσθετα, τα χημικά ομόλογα και ανάλογα βιοεντομοκτόνων μπορούν να χαρακτηριστούν ως βιοεντομοκτόνα (Ogih et al. 2019). Τα βιοεντομοκτόνα συνήθως είναι λιγότερο τοξικά από τα συμβατικά εντομοκτόνα (Kumar et al. 2021). Χαρακτηρίζονται από εκλεκτική δράση έναντι οργανισμών στόχων, σε αντίθεση με τα συμβατικά εντομοκτόνα που έχουν ευρή φάσμα δράσης ενώ η αποτελεσματικότητά τους σε μικρές ποσότητες σε συνδυασμό με τη γρήγορη αποσύνθεσή τους συνεπικουρούν στην αποφυγή της ρύπανσης του περιβάλλοντος. Τέλος, είναι αποτελεσματικά όταν χρησιμοποιούνται σε προγράμματα διαχείρισης ανθεκτικότητας και ολοκληρωμένης διαχείρισης επιβλαβών οργανισμών (IPM) ενώ μπορούν να αποτελέσουν ένα αποτελεσματικό μέσο βιολογικής διαχείρισης αυτών (Chandler et al. 2011).

Οι τρόποι δράσεις των βιοεντομοκτόνων διακρίνονται σε 5 κατηγορίες. Μπορούν να δράσουν στο νευρομυϊκό ή/και μεταβολικό σύστημα καθώς και στη διαδικασία της πέψης των εντόμων. Επιπρόσθετα, έχουν τη δυνατότητα να δράσουν ως ρυθμιστές ανάπτυξης ενώ μπορούν να δράσουν ως αναστολείς πολλαπλών θέσεων με βάση τις φυσιολογικές διεργασίες που επηρεάζουν (Sparks & Nauen 2015). Ωστόσο, ο τρόπος δράσης των βιοχημικών βιοεντομοκτόνων δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως έως σήμερα.

Στη παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε μια σειρά βιοεντομοκτόνων ως προς τη δράση τους έναντι τους ακάρεος *Varroa destructor* καθώς και έναντι ανθεκτικών πληθυσμών αυτού. Παράλληλα μελετήθηκε η συνεργιστική δράση αυτών των βιοεντομοκτόνων με το συνθετικό πυρεθροειδές εντομοκτόνο Flumethrin και η εκλεκτικότητα της δράσης αυτών των βιοεντομοκτόνων σε εργαστηριακό επίπεδο, προκειμένου να διαπιστωθούν οι επιπτώσεις της χρήσης αυτών των σκευασμάτων, σε ενήλικα άτομα *Apis mellifera* Linnaeus με χρήση κλασικών μεθόδων βιοδοκιμών.

5.3 Υλικά και Μέθοδοι

5.3.1 Χημικές ουσίες

Τα βιοεντομοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν αποτελούν διαθέσιμα εμπορικά εντομοκτόνα φυσικής προέλευσης και προέρχονται από το Ευρωπαϊκό πρόγραμμα «SuperPests» (SFS-17-2017), στόχος του οποίου ήταν η ανάπτυξη καινοτόμων εργαλείων για την ορθολογική αντιμετώπιση δυσχείριστων παρασίτων και των ασθενειών που αυτά προκαλούν. Με βάση τα αποτελέσματα του «SuperPests», σχετικά με την αποτελεσματικότητα μιας μεγάλης λίστας ουσιών απέναντι σε ανθεκτικά ακάρεα, επιλέχθηκαν τα πιο αποτελεσματικά (Πίνακας 5.1) και εξετάστηκαν για τη δράση τους έναντι τους ακάρεος *Varroa destructor* καθώς και έναντι ανθεκτικών πληθυσμών αυτού.

Πίνακας 5.1: Βιοεντομοκτόνα που εξετάστηκαν για τη δράση τους έναντι του ακάρεος *Varroa destructor*

▪ Prev-Am
▪ Flipper

Το βιοεντομοκτόνο Prev-am SL με δραστική ουσία έλαιο πορτοκαλιού, έχει δύο τρόπους δράσεις. Η χαμηλή επιφανειακή τάση του παρασκευαζόμενου διαλύματος επιτρέπει την διείσδυση αυτού από τα αναπνευστικά τρήματα του εντόμου, προκαλώντας έτσι στην ασφυξία αυτού. Επιπρόσθετα, δύναται να προκαλέσει φθορές ζωτικής σημασίας στα εξωτερικά, προστατευτικά στρώματα των οργανισμών στόχων (εξωσκελετό). Το Prev-am

συνίσταται για τη καταπολέμηση πληθώρας εντομολογικών εχθρών όπως οι αλευρώδεις (*Bemisia tabaci*), ακάρεα (*Tetranychus urticae*, *Panonychus citri* κ.α), θρίπες (*Scirtothrips aurantii*) και κικαδελίδες (*Jassid Spp.*) κ.α.

Το βιοεντομοκτόνο Flipper EW με δραστική ουσία άλατα καλίου λιπαρών οξέων φυτικής προέλευσης (C7-C20) με υψηλή συγκέντρωση παλμιτικού και ολεϊκού οξέως, έχει την ικανότητα να διαταράσσει τη λειτουργία του λιποπρωτεϊνικού πλέγματος της κυταρρικής μεμβράνης των εχθρών-στόχων, οδηγώντας στη θανάτωση τους. Το Flipper συνίσταται για τη καταπολέμηση αφίδων (*Aphididae*), τετράνυχων (*Tetranychus urticae*), θριπών (*Frankliniella occidentalis*, *Thrips fuscipennis*) κ.α.

Για τις βιοδοκιμές συνέργειας βιοεντομοκτόνων με συνθετικό εντομοκτόνο, χρησιμοποιήθηκε η δραστική ουσία *Flumethrin* 98% καθαρότητα (Sigma Aldrich, Ελλάδα) ενώ στις βιοδοκιμές οξείας τοξικότητας με μέλισσες χρησιμοποιήθηκε το συνθετικό νεονικοτινοειδές Confidor 200 SL (Bayer) με δραστική ουσία το Imidacloprid.

5.3.2 Συλλογή πληθυσμών *Varroa*, μελισσών και βιοδοκιμές

Τα βιοεντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται για τη καταπολέμηση ζωικών εχθρών έχουν ένα ή και περισσότερους τρόπους δράσης. Αυτοί διακρίνονται σε τοξικότητα μέσω επαφής, μέσω τροφής, με απώθηση των εχθρών ενώ μπορούν να δράσουν παρεμποδίζοντας τη τροφή, την ανάπτυξη ή ακόμα και την αναπαραγωγή αυτών.

Τα βιοεντομοκτόνα που εξετάστηκαν για τη δράση τους, έναντι του ακάρεος *Varroa destructor* καθώς και έναντι ανθεκτικών πληθυσμών αυτού, αξιολογήθηκαν ως προς τοξικότητα τους μέσω επαφής, προσομοιώνοντας τον τρόπο δράσης των εντομοκτόνων που χρησιμοποιούνται για τη καταπολέμηση του παρασίτου σε συνθήκες πεδίου.

Για τη πραγματοποίηση των βιοδοκιμών με καταβύθιση σε διαλύματα εντομοκτόνων ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του Jonsson et al. (2007) με ορισμένες τροποποιήσεις. Ενήλικα άτομα *Varroa destructor* εκτίθενται σε συνιστώμενες δόσεων βιοεντομοκτόνων διαλυμένων σε απεσταγμένο νερό, με καταβύθιση αυτών στα παρασκευαζόμενα διαλύματα. Η διάρκεια της εξέτασης είναι 20h. Εφόσον η θνησιμότητα του μάρτυρα παραμένει σε αποδεκτά επίπεδα (<10%) μετά το πέρας της εξέτασης, λαμβάνουμε υπόψιν την επέμβαση.

Συλλογή βιολογικού υλικού

Για τη δειγματοληψία των Βαρρόα παίρνουμε από κάθε κυψέλη, πλαίσια με σφραγισμένο γόνο και τα μεταφέρουμε στο χώρο του εργαστηρίου. Με τη βοήθεια μιας λαβίδας αφαιρούμε το κέρινο κάλυμμα από μερικά κελιά σφραγισμένου γόνου και σύρουμε έξω τη προνούμφη. Ύστερα με τη βοήθεια ενός πινέλου συλλέγουμε τα *Varroa* που βρίσκονται είτε πάνω στη προνούμφη, είτε μέσα στο κελί και τα τοποθετούμε μέσα σε ένα τρυβλίο, στο οποίο θα έχει τοποθετηθεί υγρό κομμάτι χαρτιού ώστε να μην αφυδατωθούν τα *Varroa*, μέχρι την εργαστηριακή εξέταση τους.

Προετοιμασία δόσεων

Παρασκευάζονται διαλύματα του βιοεντομοκτόνου που θα εξεταστεί, σε απεσταγμένο νερό με χρήση στεγνωτικού παράγοντα (Triton X-100). Πριν τη πραγματοποίηση των βιοδοκιμών παρασκευάζονται φρέσκα διαλύματα διαφόρων συγκεντρώσεων και ποσότητα 2mL διαλύματος από κάθε συγκέντρωση μεταφέρεται εντός Eppendorf tube χωρητικότητας 2mL.

Για τον μάρτυρα χρησιμοποιείται απεσταγμένο νερό με χρήση στεγνωτικού παράγοντα (Triton X-100, 1/1000) . Δημιουργούνται δύο ομάδες εκ των οποίων στη μια χρησιμοποιείται νερό και στη δεύτερη το προς εξέταση βιοεντομοκτόνο. Οι δόσεις που εξετάστηκαν είναι 0.5x, 1x, 10x της συνιστώμενης δόσης (F.D) έναντι ακάρεων, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η συνιστώμενη δόση για το βιοεντομοκτόνο **Prev-am** είναι 0.4% και για το **Flipper** είναι 2%. Ως εκ τούτου το Prev-am αξιολογήθηκε στις δόσεις 0.2%, 0.4% και 4% ενώ το Flipper στις παρακάτω δόσεις 1%, 2% και 20% για 0.5x F.D, 1x F.D και 10x F.D αντίστοιχα.

Η υψηλής καθαρότητας δ.ο *Flumethrin* (>98% καθαρότητα, Sigma Aldrich) διαλύθηκε, με τη χρήση του οργανικού διαλύτη Ακετόνη, με στόχο τη δημιουργία διαλύματος υψηλής συγκέντρωσης (Stock Solution) και το οποίο διατηρήθηκε σε θερμοκρασία -20°C. Πριν τη πραγματοποίηση των βιοδοκιμών παρασκευάζονταν φρέσκα διαλύματα διαγνωστικής συγκέντρωσης και ποσότητα 0.5 mL διαλύματος από συγκέντρωση θανατώνει το 10% του πληθυσμού AUA (LC_{10_AUA}) τοποθετούταν εντός ξεχωριστών γυάλινων φιαλιδίων (Vials) (Kimble, 60965D-3). Τα vials περιστρέφονταν ούτως ώστε να διαμοιραστεί ομοιόμορφα εντός αυτών η δ.ο. Καθώς η ακετόνη εξατμιζόταν, δημιουργήθηκε ένα λεπτό στρώμα εντομοκτόνου στην εσωτερική επιφάνεια των vials. Τα εμποτισμένα vials αφέθηκαν τουλάχιστον δύο ώρες για να στεγνώσουν, πριν χρησιμοποιηθούν για τις βιοδοκιμές. Η συγκέντρωση LC_{10_AUA}

ορίστηκε στα 0.005 ppm και προέκυψε από βιοδοκιμές δόσης-απόκρισης του ευαίσθητου πληθυσμού AUA και έρχεται σε συμφωνία με τις βιοδοκιμές του ευαίσθητου πληθυσμού DE-FS (Κεφάλαιο 3, Πίνακας 8).

Βιοδοκιμές βιολογικού υλικού (Βαρρόα)

Στη συνέχεια, ομάδες των 10 ατόμων ενήλικων Βαρρόα βυθίζονται, εντός του προς εξέταση διαλύματος, για 60 sec στους 25°C. Μετά το πέρας του χρόνου, τα βαρρόα αφαιρούνται από το διάλυμα, στεγνώνουν με τη χρήση διηθητικού χαρτιού και μεταφέρονται σε γυάλινα φιαλίδια (vials).

Στις βιοδοκιμές εξέτασης συνέργειας, τα Βαρρόα μετά τη καταβύθιση τους στα εξεταζόμενα διαλύματα σύμφωνα με τις προηγούμενες οδηγίες, στέγνωναν με τη χρήση διηθητικού χαρτιού και μεταφέρονταν σε εμποτισμένα με Flumethrin, γυάλινα φιαλίδια.

Τα vials τοποθετούνται εντός επωαστικού θαλάμου, σε συνθήκες σκότους, στους 25 °C για 20 ώρες. Μετά το πέρας των 20 ωρών, πραγματοποιείται καταμέτρηση της θνησιμότητας των ακάρεων. Ως νεκρά χαρακτηρίζονται τα ακάρεα τα οποία δεν μπορούν να περπατήσουν μετά το ελαφρύ ακούμπημα με πινέλο. Απόρροια των αποτελεσμάτων είναι η αξιολόγηση της τοξικότητας για το εκάστοτε βιοεντομοκτόνο ή εντομοκτόνο. Ως μάρτυρας χρησιμοποιούνται Βαρρόα που βυθίστηκαν σε απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό (H₂O) και μεταφέρθηκαν σε vials εμποτισμένα μόνο με ακετόνη. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε σύμφωνα με το μοντέλο Πιθανομονάδας (Probit analysis).

Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκε η δράση των βιοεντομοκτόνων έναντι ενός ευαίσθητου πληθυσμού Βαρρόα που διατηρείται στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και χαρακτηρίζεται ως ευαίσθητος καθότι έχει διατηρηθεί χωρίς χημική καταπολέμηση τουλάχιστον για τα τελευταία 20 χρόνια (συντομογραφία ATH-S, Athens Susceptible). Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα των βιοεντομοκτόνων έναντι του πληθυσμού Βαρρόα Andros που έχει χαρακτηριστεί ως ανθεκτικός στη δ.ο Coumaphos(συντομογραφία AN-CR, Andros Coumaphos Resistant) (βλ.Κεφάλαιο 2) και του πληθυσμού Βαρρόα Sparti (συντομογραφία SP-PR, Sparti Pyrethroid Resistant) που έχει χαρακτηριστεί ως ανθεκτικός στα πυρεθροειδή ακαρεοκτόνα (βλ. Κεφάλαιο 3). Παράλληλα μελετήθηκε και η συνεργιστική δράση αυτών των βιοεντομοκτόνων με το ευρώς χρησιμοποιούμενο συνθετικό εντομοκτόνο έναντι του Βαρρόα, *Flumethrin* σε χαμηλή συγκέντρωση (LC_{10_AUA}).

Για τη μελέτη ελέγχου οξείας τοξικότητας βιοεντομοκτόνων μέσω επαφής σε μέλισσες ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του (OECD 1998) με ορισμένες τροποποιήσεις. Ενήλικες εργάτριες μέλισσες εκτέθηκαν σε συνιστώμενες δόσεων βιοεντομοκτόνων διαλυμένων σε απεσταγμένο νερό, μέσω τοπικής εφαρμογής στον θώρακα (σταγόνες). Η διάρκεια κάθε εξέτασης είναι 48h. Αν η θνησιμότητα αυξάνεται μεταξύ 24h-48h ενώ η θνησιμότητα του μάρτυρα παραμένει σε αποδεκτά επίπεδα (<10%), συνεχίζουμε την αξιολόγηση με επέκταση της διάρκειας μέχρι τις 96h (4 ημέρες).

Συλλογή και τάισμα μελισσών

Χρησιμοποιούνται ενήλικες εργάτριες μέλισσες παρόμοιας ηλικίας. Οι μέλισσες πρέπει να προέρχονται από υγιή, δυνατά μελίσσια, τα οποία διαθέτουν βασίλισσα και δεν έχει προηγηθεί χρήση εντομοκτόνων για τουλάχιστον 4 εβδομάδες. Η συλλογή γίνεται από πλαίσια όπου δεν υπάρχει γόνος και οι ενήλικες εργάτριες μεταφέρονται εντός κλωβών από plexiglass. Στα κλουβιά τοποθετείται διάλυμα σουκρόζης 50% (w/v) που χρησιμοποιείται ως τροφή για τις μέλισσες. Τα κλουβιά τοποθετούνται στους 25°C (μέγιστο 20 μέλισσες/κλωβό) (Εικόνα 5.1).

Αναισθητοποίηση μελισσών

Πραγματοποιείται αναισθητοποίηση των μελισσών με χρήση CO₂ πριν την εφαρμογή του βιοεντομοκτόνου. Οι νωχελικές μέλισσες πρέπει να απορρίπτονται πριν τη διεξαγωγή του πειράματος και να αντικαθίστανται με υγιείς.

Προετοιμασία δόσεων

Παρασκευάζονται διαλύματα του βιοεντομοκτόνου που θα εξεταστεί, σε απεσταγμένο νερό με χρήση στεγνωτικού παράγοντα (Triton X-100). Για τον μάρτυρα χρησιμοποιείται απεσταγμένο νερό με χρήση στεγνωτικού παράγοντα (Triton X-100, 1/1000) . Δημιουργούνται ομάδες εκ των οποίων στη μια χρησιμοποιείται νερό και στις υπόλοιπες τα προς εξέταση βιοεντομοκτόνα. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το νεονικοτινοειδές εντομοκτόνο Confidor, με αποδεδειγμένα μελισσοτοξική δράση, στη συνιστώμενη δόση του. Οι δόσεις που εξετάστηκαν είναι η 1x (F.D) έναντι ακάρεων, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η συνιστώμενη δόση για το βιοεντομοκτόνο **Prev-am** είναι 0.4% και για το **Flipper** είναι 2%. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το νεονικοτινοειδές εντομοκτόνο **Confidor** με δ.ο το

imidacloprid, με αποδεδειγμένα μελισσοτοξική δράση, στη συνιστώμενη δόση του 750 ppm. Πραγματοποιούνται τουλάχιστον 3 επαναλήψεις ανά ομάδα (10 μέλισσες) για κάθε συγκέντρωση δοκιμής. Σε κάθε επανάληψη χρησιμοποιείται και μια ομάδα μάρτυρα.

Βήμα 5: Βιοδοκιμές βιολογικού υλικού (μέλισσες)

Μετά την αναισθητοποίηση των μελισσών με CO₂ πραγματοποιείται τοπική εφαρμογή 1μL διαλύματος του προς εξέταση βιοεντομοκτόνου. Η εφαρμογή γίνεται με τη χρήση πιπέτας στη ραχιαία όψη του θώρακα κάθε μέλισσας. Μετά την εφαρμογή, οι μέλισσες μεταφέρονται εντός των κλωβών και προσθέτουμε διάλυμα σουκρόζης (50% w/v) ως πηγή τροφής. Οι κλωβοί με τις μέλισσες τοποθετούνται σε συνθήκες σκότους, με θερμοκρασία 25±2 °C και σχετική υγρασία 50-70%. Καταγράφεται η θνησιμότητα 4h μετά την εφαρμογή και στη συνέχεια κάθε 24h με χρονικό μέγιστο παρατηρήσεων τις 96h, με τη προϋπόθεση η θνησιμότητα του μάρτυρα να μην υπερβαίνει το 10%. Επίσης καταγράφεται κάθε μη φυσιολογική συμπεριφορά κατά τη διάρκεια διεξαγωγής της πειραματικής διαδικασίας.



Εικόνα 5.1. Κλωβός από plexiglass που χρησιμοποιήθηκε για τις μελέτες μελισσοτοξικότητας των βιοεντομοκτόνων

5.4 Αποτελέσματα

5.4.1 Αξιολόγηση αποτελεσματικότητας βιοεντομοκτόνων φυσικής προέλευσης για την αντιμετώπιση δυσεξόντοτων – ανθεκτικών πληθυσμών Βαρρόα

Τρεις πληθυσμοί Βαρρόα επιλέχθηκαν με βάση το προφίλ ευαισθησίας τους στα συνθετικά ακαρεοκτόνα και εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα δυο βιοεντομοκτόνων, σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις επέμβασης έναντι αυτών. Στη συνιστώμενη δόση που αναγράφουν οι κατασκευαστές των βιοεντομοκτόνων για χρήση έναντι ακάρεων, το Prev-Am εμφάνισε αποτελεσματικότητα 78% στον ευαίσθητο πληθυσμό (AUA-S) ενώ σε παραπλήσια επίπεδα κινήθηκε και η δραστηριότητα του σκευάσματος έναντι των ανθεκτικών πληθυσμών AN-CR και SP-PR με θνησιμότητα επί των επεμβάσεων 76% και 80% αντίστοιχα. Το βιοεντομοκτόνο Flipper εμφάνισε παρόμοια δραστηρική ικανότητα με 75% στον ευαίσθητο πληθυσμό AUA-S, 78% στον ανθεκτικό στο Coumarphos, πληθυσμό AN-CR και 70% στον πληθυσμό SP-PR (Πίνακας 5.2). Η απόκριση των βιοεντομοκτόνων έναντι του ακάρεως *Varroa destructor* στη συνιστώμενη δόση 1xFD κρίνεται ικανοποιητική και θα μπορούσε να αποτελέσει ένα μεσο διαχείρισης της ανθεκτικότητας του Βαρρόα σε άλλα ακαρεοκτόνα.

Πίνακας 5.2. Ποσοστιαία θνησιμότητα πληθυσμών Βαρρόα σε διάφορες δόσεις των βιοεντομοκτόνων Prev-am και Flipper

Πληθυσμός	n	(%) Θνησιμότητα (AV±SE)		
		0.5x F.D	1x F.D	10x F.D
Prev-Am				
Athens (AUA-S)	120	58±5	78±5	91±3
Andros (AN-CR)	90	55±3	76±4	92±3
Sparti (SP-PR)	90	56±3	80±5	94±2

Flipper		0.5x F.D	1x F.D	10x F.D
Athens (AUA-S)	120	50±6	75±9	95±3
Andros (AN-CR)	90	53±4	78±6	94±4
Sparti (SP-PR)	90	51±5	70±4	91±3

n: αριθμός Βαρρόα που εξετάστηκαν (σε ομάδες των 10);
x F.D: Πολλαπλάσιο της συνιστώμενης δόσης του προμηθευτή
F.D (συνιστώμενη δόση) Prev-am = 0.4%
F.D (συνιστώμενη δόση) Flipper = 2%
AV=M.O
SE= Τυπικό σφάλμα

5.4.2 Αξιολόγηση της συνεργιστικής δράσης βιοεντομοκτόνων φυσικής προέλευσης με το συνθετικό πυρεθροειδές ακαρεοκτόνο *Flumethrin*

Στη συνέχεια εξετάστηκε η συνεργιστική δράση των βιοεντομοκτόνων σε διάφορες συγκεντρώσεις (0.5x FD, 1x FD και 10xFD) με μικρή συγκέντρωση (LC_{10}) του συνθετικού ακαρεοκτόνου *Flumethrin* στον πληθυσμό AUA-S. Η επιλογή του ευαίσθητου πληθυσμού AUA έγινε με στόχο να αποκλειστεί η πιθανότητα κάποιος μηχανισμός ανθεκτικότητας (αλλαγές στις εκφράσεις των ενζύμων αποτοξικοποίησης ή ανθεκτικότητα σημείου στόχου) να επηρεάσει τα δεδομένα των βιοδοκιμών. Τα αποτελέσματα της μελέτης (Πίνακας 5.3) φανερώνουν μικρή συνέργεια μεταξύ των βιοεντομοκτόνων και ελάχιστης δόσης του εντομοκτόνου *Flumethrin*, με στατιστικά μικρή αύξηση της θνησιμότητας του Βαρρόα.

Πίνακας 5.3. Ποσοστιαία θνησιμότητα Βαρρόα (AUA-S) μετά από έκθεση σε διάφορες δόσεις βιοεντομοκτόνων και σε πυρεθροειδές εντομοκτόνο.

Θεραπεία	n	(%) Θνησιμότητα(AV±SE)		
		0.5x F.D	1x F.D	10x F.D
Prev-am	120	58±5	78±5	91±3
Prev-am +Flumethrin (5*10 ⁻³ ppm)	90	65±3	84±5	97±3
Flipper	120	50±6	75±9	95±3
Flipper +Flumethrin (5*10 ⁻³ ppm)	90	63±4	82±4	94±4

n: αριθμός Βαρρόα που εξετάστηκαν (σε ομάδες των 10);

x F.D: Πολλαπλάσιο της συνιστώμενης δόσης του προμηθευτή

F.D (συνιστώμενη δόση) Prev-am = 0.4%

F.D (συνιστώμενη δόση) Flipper = 2%

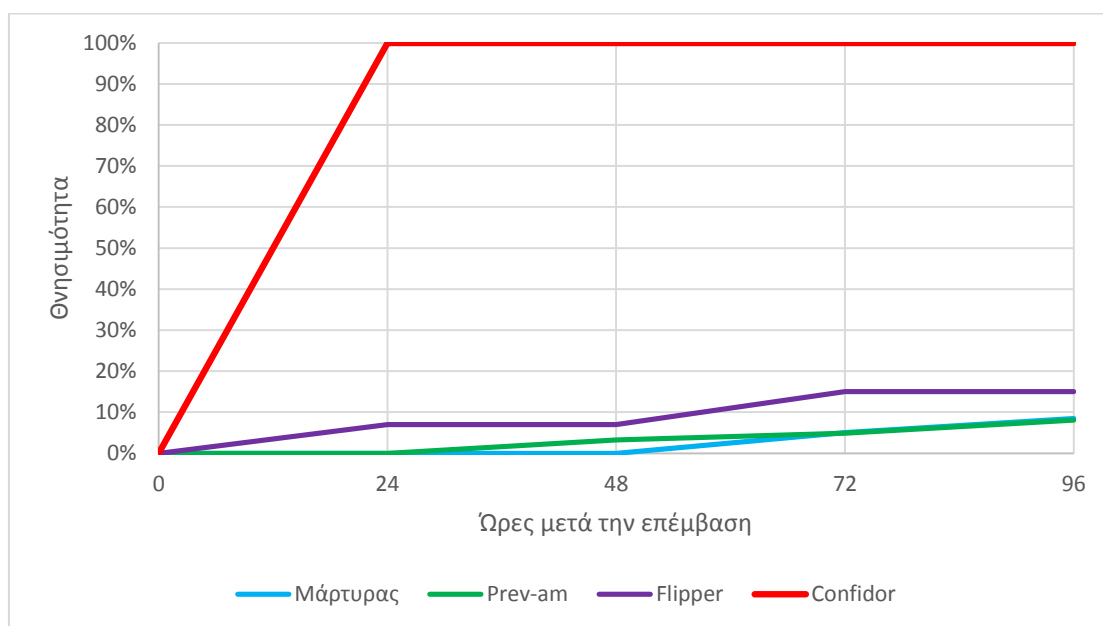
AV=M.O

SE= Τυπικό σφάλμα

5.4.3 Έλεγχος οξείας τοξικότητας βιοεντομοκτόνων μέσω επαφής σε μέλισσες (*Apis mellifera*)

Ακολούθησε μελέτη της μελισσοτοξικής δράσης των βιοεντομοκτόνων με έλεγχο της οξείας τοξικότητας μέσω επαφής σε ενήλικες εργάτριες μέλισσες *Apis mellifera* Linnaeus. Για την αξιολόγηση αυτή, ακολουθήθηκε το εξειδικευμένο πρωτόκολλο 214 του OECD (1998) βασισμένο στις οδηγίες του Ευρωπαϊκού και Μεσογειακού Οργανισμού Προστασίας Φυτών (EPPO) για την αξιολόγηση των επιπτώσεων της χρήσης φυτοπροστατευτικών προϊόντων στις μέλισσες. Η αξιολόγηση της τοξικότητας έγινε μέσω επαφής, προσομοιώνοντας τον τρόπο δράσης των εντομοκτόνων που χρησιμοποιούνται για τη καταπολέμηση του παρασίτου σε συνθήκες πεδίου, ακολουθώντας το πρωτόκολλο όπως αυτό περιγράφεται αναλυτικά στα

«Υλικά και Μέθοδοι». Η επέμβαση των βιοεντομοκτόνων έγινε στη συνιστώμενη δόση, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή ενώ χρησιμοποιήθηκε και ως θετικός μάρτυρας το νεονικοτινοειδές εντομοκτόνο Confidor με δ.ο το Imidacloprid και αποδεδειγμένη μελισσοτοξική δράση (Bailey et al. 2005). Μετά το πέρας της εξέτασης (96h) η θνησιμότητα του μάρτυρα ήταν 9%, των μελισσών που είχαν εκτεθεί στο Prev-Am ήταν στο 8,1% και στο Flipper στα επίπεδα του 15%. Επιπλέον, η χρήση του Confidor ως θετικός μάρτυρας επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα καθώς το σύνολο των μελισσών (100%) θανατώθηκαν εντός των πρώτων 24 ωρών, στη συνιστώμενη δόση.



Εικόνα 5.2. Ποσοστιαία θνησιμότητα ενήλικων μελισσών ύστερα από έκθεση στη συνιστώμενη δόση δύο βιοεντομοκτόνων (Prev-am, Flipper) και νεονικοτινοειδές εντομοκτόνου (Confidor) μέσω επαφής.

5.5 Συζήτηση

Οι μελισσοκόμοι σε όλο το κόσμο προσπαθούν να λάβουν μέτρα περιορισμού του παρασίτου των μελισσών *V. Destructor*. Οι πλειοψηφία των μελισσοκόμων επεμβαίνουν έναντι του ακάρεως κυρίως με χημικά μέσα. Η χρήση επιλεκτικών ακαρεοκτόνων περιορίζει σημαντικά τη προσβολή του Βαρρόα, όμως συνοδεύεται και από αυξημένους κινδύνους όπως η ύπαρξη υπολειμμάτων ακαρεοκτόνων που υποβαθμίζουν τα προϊόντα της μέλισσας. Η ύπαρξη υπολειμμάτων φαρμάκων είναι επικίνδυνα για την υγεία του καταναλωτή ενώ ευνοούν σημαντικά την ανάπτυξη ανθεκτικότητας του παρασίτου στις εν λόγω ουσίες (Philbert et al. 2014). Παράλληλα η παρουσία χημικών εντομοκτόνων εντός της κυψέλης έχει

βραχυχρόνιες ή/και μακροχρόνιες επιπτώσεις στην υγεία των μελισσών καθώς έχουν συσχετιστεί με προβλήματα στην ανάπτυξη βασιλισσών, στη συμπεριφορά και στη μείωση του σωματικού βάρους όπως συμβαίνει στη περίπτωση του Coumaphos και πολλές φορές υπάρχει αρνητική συσχέτιση της παρουσίας εντομοκτόνου και της ανάπτυξης του μελισσοσμίνου όπως συμβαίνει με τη χρήση του οξαλικού οξέως (Gregorc 2005; Higes et al. 1999). Συνέπεια των ανωτέρω είναι η ανάγκη για τον επαναπροσδιορισμό της χρήσης αυτών των ουσιών στα πλαίσια της βιώσιμης γεωργίας, συνοδευόμενη από την ανάπτυξη και χρήση εντομοκτόνων ουσιών φυσικής προέλευσης (green chemicals), φιλικών προς τις μέλισσες και το περιβάλλον στο σύνολο του, όμως με εκλεκτική δράση έναντι του Βαρρόα.

Στη μελέτη αυτή εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα της χρήσης δύο εμπορικών σκευασμάτων βιοεντομοκτόνων (**Prev-Am, Flipper**) έναντι ενός ευαίσθητου πληθυσμού Βαρρόα (ATH-S) σε εύρος δόσεων με χρήση μεθόδων βιοδοκιμών, με την δραστηριότητα και των δυο να κρίνεται αποδεκτή στη συνιστώμενη δόση για χρήση στον αγρό. Τα βιοεντομοκτόνα έδειξαν αντίστοιχα θετική απόκριση και σε δύο ανθεκτικούς πληθυσμούς στο Coumaphos (AN-CR) και στα πυρεθροειδή (SP-PR) εντομοκτόνα, φανερώνοντας την ικανότητά τους να συμμετάσχουν σε προγράμματα διαχείρισης ανθεκτικότητας και ολοκληρωμένης διαχείρισης επιβλαβών οργανισμών (IPM).

Στη συνέχεια μελετήθηκε η συνεργιστική δράση των δύο βιοεντομοκτόνων με το ευρέως χρησιμοποιούμενο πυρεθροειδές ακαρεοκτόνο *Flumethrin* μέσω βιοδοκιμών επαφής, στον ευαίσθητο πληθυσμό (AUA-S), με τη συνέργεια να χαρακτηρίζεται ως χαμηλή. Ως εκ τούτου, από τις βιοδοκιμές δεν υποδεικνύεται κάποια τομή στους μηχανισμούς δράσεις των βιοεντομοκτόνων με το *Flumethrin*.

Απαραίτητη προϋπόθεση για την ενδοκυψελιακή χρήση ενός σκευάσματος αποτελεί η μελέτη μελισσοτοξικότητας αυτού. Πραγματοποιήθηκαν μελέτες βιοδοκιμών επαφής σύμφωνα με πρωτόκολλο για την αξιολόγηση των επιπτώσεων της χρήσης φυτοπροστατευτικών προϊόντων στις μέλισσες. Η μελέτη βραχείας τοξικότητας (96h) των μελισσών είχε ως αποτέλεσμα μικρό ποσοστό θνησιμότητας και στα δύο βιοεντομοκτόνα, με μικρή απόκλιση από τον αρνητικό μάρτυρα. Η χρήση του Confidor με δ.ο το Imidacloprid, ως θετικό μάρτυρα, εξασφάλισε την ορθή λειτουργία του πρωτοκόλλου καθότι όλες οι μέλισσες θανατώθηκαν εντός 24 ωρών από την επέμβαση. Φυσικά, η διεξαγωγή εργαστηριακών εφαρμογών πρέπει να συνοδεύεται από εφαρμογές πεδίου και αποτελούν αρχικές μελέτες για τον προσδιορισμό των ιδιοτήτων ενός προϊόντος ενώ επιτρέπουν καλύτερη παρακολούθηση των συνθηκών επέμβασης.

Κεφάλαιο 6. Συζήτηση – Προοπτικές

Ο κλάδος της μελισσοκομίας αποτελεί ένα σημαντικό μερίδιο του γεωργικού τομέα της χώρας ενώ συμβάλλει στην αγροτική ανάπτυξη, επιτυγχάνοντας την ποσοτική και ποιοτική βελτίωση γεωργικών προϊόντων στα πλαίσια της αειφόρου ανάπτυξης. Η κατάταξη της Ελλάδας στην 6^η θέση μεταξύ των χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης σε αριθμό κυψελών (1.631.000) και περίπου 10.000 μελισσοκόμους στο σύνολο της επικράτειας (European Commission 2020), φανερώνει τη δυναμική που έχει ο κλάδος στην αγροτική παραγωγή και οικονομία της χώρας. Η μελισσοκομία της Ελλάδας εμφανίζει συνεχή ανάπτυξη με το πέρασμα του χρόνου, αντιμετωπίζοντας με επιτυχία τις διαρκείς μεταβολές που παρατηρούνται τόσο με τη συρρίκνωση του αγροτικού τομέα, όσο και με τις κλιματικές μεταβολές που έχουν εντατικοποιηθεί τα τελευταία χρόνια. Η ανάπτυξη αυτή παρουσίασε μικρή ανάσχεση τα τέλη της δεκαετίας του 1980, καθώς συνοδεύτηκε με την εμφάνιση του εκτοπαρασιτικού ακάρεως των μελισσών *Varroa destructor* (Acari:Varroidae). Η εισβολή του Βαρρόα στον Ελλαδικό χώρο, είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια χιλιάδων μελισσοσμηνών και τους μελισσοκόμους να προσπαθούν εναγωνίως να περιορίσουν αυτό το τόσο σημαντικό εχθρό. Για την καταπολέμηση του *Varroa* χρησιμοποιήθηκαν πολλές δραστικές ουσίες συνοδευόμενες με πληθώρα επεμβατικών μεθόδων. Τα καλύτερα αποτελέσματα έναντι του παρασίτου, εμφάνισαν τα συνθετικά χημικά σκευάσματα. Οι δραστικές ουσίες που εξασφάλισαν έγκριση για χρήση στη μελισσοκομία είναι το οργανοφωσφορικό ακαρεοκτόνο Coumaphos, τα πυρεθροειδή ακαρεοκτόνα tau-fluvalinate, flumethrin και η φορμαμιδίνη Amitraz. Όμως, η μειωμένη δυνατότητα εναλλαγής δραστικών ουσιών είχε ως αποτέλεσμα την επαναλαμβανόμενη και εκτεταμένη χρήση σκευασμάτων που περιείχαν τις προαναφερθείσες δ.ο. Αποτέλεσμα αυτής της πρακτικής είναι η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο σύνολο των συνθετικών χημικών σκευασμάτων που χρησιμοποιούνται στη μελισσοκομία. Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας που έχει αναπτύξει το Βαρρόα έναντι του Coumaphos δεν ήταν γνωστός μέχρι και σήμερα, ενώ μεταλλαγές ανθεκτικότητας του βαρρόα στα πυρεθροειδή και στο Amitraz έχουν αποσαφηνιστεί από González-Cabrera et al. (2013) και Hernández-Rodríguez et al. (2021). Η διερεύνηση των μηχανισμών που ευθύνονται για την ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα οδηγεί στην «ανακάλυψη» και ταυτοποίηση ενζύμων τα οποία ενεργοποιούν ή αποτοξικοποιούν τις χημικές ουσίες, καθώς και των μεταλλαγών που διαφοροποιούν τις πρωτεΐνες στόχους και προκαλούν ανθεκτικότητα.

Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε διερεύνηση των επιπέδων και χαρακτηρισμός του μηχανισμού ανθεκτικότητας του Βαρρόα στο Coumarphos (Κεφάλαιο 1). Πιο συγκεκριμένα συλλέχθηκαν και εξετάστηκαν πληθυσμοί Βαρρόα από διάφορες περιοχές της χώρας. Ύστερα από εξέταση της ευαισθησίας τους στη δ.ο Coumarphos, εντοπίστηκε ένας πληθυσμός από την Άνδρο, με βεβαρημένο ιστορικό χρήσης, που παρουσίασε πολύ υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας (RR = 217) σε σύγκριση με τον ευαίσθητο πληθυσμό αναφοράς. Με χρήση ραδιοσημασμένου [¹⁴C] coumarphos, μελετήσαμε τη ποσότητα εισερχόμενου εντομοκτόνου εντός των βαρρόα και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ανθεκτικότητα δεν οφείλεται σε μειωμένη είσοδο Coumarphos στα ανθεκτικά Βαρρόα. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της ενεργότητας των ενζύμων αποτοξικοποίησης, ούτως ώστε να διαπιστωθεί αν η ανθεκτικότητα είναι απόρροια της αυξημένης μεταβολικής δράσης των ενζύμων αποτοξικοποίησης (CCEs, Mos, GSTs) στα ανθεκτικά βαρρόα, ενώ έγινε μέτρηση και της ενεργότητας της ακετυλοχολινεστεράσης που αποτελεί τον στόχο του Coumarphos. Από τις βιοχημικές μελέτες προέκυψε ότι η ανθεκτικότητα δεν σχετίζεται με αυξημένη αποτοξικοποίηση στα ανθεκτικά βαρρόα, ούτε με μεταλλαγή του στόχου του εντομοκτόνου. Η διερεύνηση της μεταγραφικής βάσης της ανθεκτικότητας του Βαρρόα στο Coumarphos με αλληλούχηση RNA εμφάνισε μειωμένη έκφραση των κυτοχρωμικών P450 μονοοξυγενασών *CYP4EP4*, *CYP3012A6* στα ανθεκτικά Βαρρόα. Με χρήση της τεχνικής RNAi, προκλήθηκε σίγηση των δύο P450s σε ευαίσθητα βαρρόα. Η σίγηση της *CYP4EP4* απέτρεψε την ενεργοποίηση του Coumarphos στον τοξικό μεταβολίτη Coroxon με αποτέλεσμα να αυξηθεί η αντοχή των ευαίσθητων Βαρρόα στη δ.ο Coumarphos. Ως εκ τούτων, προκύπτει ότι η μειωμένη έκφραση της *CYP4EP4* σε Βαρρόα, αποτρέπει την ενεργοποίηση του προεντομοκτόνου Coumarphos με αποτέλεσμα να οδηγεί σε ανθεκτικότητα. Η αποσαφήνιση του μηχανισμού ανθεκτικότητας του Βαρρόα στο Coumarphos μας επιτρέπει την ανάπτυξη διαγνωστικών εργαλείων για τον εντοπισμό και τη διαχείριση περιστατικών ανθεκτικότητας με τη χρήση μοριακών μεθόδων, όπως αυτές περιγράφονται στο δεύτερο κεφάλαιο.

Στα πυρεθροειδή ακαρεοκτόνα έχουν γίνει εκτεταμένες αναφορές περιστατικών ανθεκτικότητας του Βαρρόα παγκοσμίως. Ο πιο συχνά αναφερόμενος μηχανισμός ανθεκτικότητας αφορά σημειακές αντικαταστάσεις στο κανάλι μεταφοράς ιόντων νατρίου (VGSC) που αποτελεί τον στόχο των πυρεθροειδών εντομοκτόνων. Στο 3^ο κεφάλαιο της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε ανίχνευση και παρακολούθηση ανθεκτικότητας στόχου σε πυρεθροειδή, πληθυσμών Βαρρόα που συλλέχθηκαν από περιοχές της Ελλάδας και

του Βελγίου. Και στις δύο περιπτώσεις, έγινε καταγραφή του ιστορικού χρήσης των επεμβάσεων σύμφωνα με τους μελισσοκόμους και τα βαρρόα αναλύθηκαν για την ύπαρξη μεταλλάξεων στη θέση 925 του VGSC. Μέσω μοριακής αλληλούχισης εντοπίστηκε πληθυσμός Βαρρόα που εμφάνιζε τον γονότυπο L925V σε ομόζυγο κατάσταση (95%) και συγκρίθηκε με πληθυσμό που αποτελούταν από ευαίσθητα Βαρρόα που έφεραν τον γονότυπο L925. Στόχος της σύγκρισης ήταν η διερεύνηση της συμμετοχής των μεταλλαγών L925 στην ευαισθησία και την ανθεκτικότητα στη δ.ο Flumethrin για πρώτη φορά. Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών έδειξαν πως τα ακάρεα του ανθεκτικού πληθυσμού ήταν 12,6 φορές περισσότερο ανθεκτικά από το ευαίσθητο στέλεχος. Η παρακολούθηση των μεταλλαγών ανθεκτικότητας φανερώνει την υψηλή παρουσία ανθεκτικών γονότυπων τόσο σε ομοζύγωτη όσο και ετεροζύγωτη κατάσταση, ακόμα και σε πληθυσμούς που δεν είχαν θεραπευτεί με πυρεθροειδή ακαρεοκτόνα.

Στο 4^ο κεφάλαιο, διερευνήθηκε η αποτελεσματικότητα του Amitraz σε πληθυσμούς Βαρρόα από διάφορες περιοχές της Ελλάδας καθώς και σε ανθεκτικούς πληθυσμούς σε άλλα ακαρεοκτόνα. Έγινε συλλογή πληθυσμών Βαρρόα από διάφορες περιοχές της χώρας και καταγραφή του ιστορικού επεμβάσεων από τους μελισσοκόμους. Με κλασικές βιοδοκιμές επαφής σε έναν ευαίσθητο πληθυσμό Βαρρόα προέκυψε η καμπύλη τοξικότητας στη δ.ο Amitraz και η οποία συνετέλεσε στον ορισμό της διαγνωστικής δόσης. Οι προς εξέταση πληθυσμοί Βαρρόα εκτέθησαν στη διαγνωστική δόση, με σκοπό τη διερεύνηση της μειωμένης ευαισθησίας στη δ.ο Amitraz. Από τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών προέκυψε πληθυσμός Βαρρόα με ελάχιστα μειωμένη ευαισθησία, ο οποίος προήλθε από μελισσοκομείο στο οποίο ο μελισσοκόμος έκανε αποκλειστική χρήση Amitraz, τα τελευταία πέντε έτη. Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στη δ.ο Amitraz έχει συσχετιστεί με μοριακές μεταλλαγές στις θέσεις 87 και 215 του β-αδενεργικό υποδοχέα της οκτοπαμίνης στο Βαρρόα. Η εφαρμογή των μοριακών διαγνωστικών σε Βαρρόα από τους πληθυσμούς που συλλέχθηκαν, δεν εντόπισε αλληλόμορφα που έχουν συσχετιστεί με ανθεκτικότητα στο Amitraz. Σε συνδυασμό με τα δεδομένα των βιοδοκιμών επαφής, προκύπτει η αποτελεσματικότητα του Amitraz έναντι πληθυσμών Βαρρόα που έχουν χαρακτηριστεί ανθεκτικοί στο Coumaphos και στα πυρεθροειδή tau-fluvalinate και flumethrin. Ο μη εντοπισμός περιστατικών διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ του Amitraz και των άλλων δραστικών ουσιών που χρησιμοποιούνται για τη καταπολέμηση του Βαρρόα, θα μπορούσε να επιτρέψει τη διαχείριση περιστατικών ανθεκτικότητας με εναλλαγή της χρήσης των παρασιτοκτόνων ουσιών στη μελισσοκομία.

Εφαρμογές της έρευνας της διδακτορικής διατριβής μεταξύ άλλων αφορούν, (α) στην ανάπτυξη μη τοξικών – φιλικών προς το περιβάλλον ενζυμικών παρεμποδιστών, οι οποίοι ενσωματώνονται στα σκευάσματα των φαρμάκων και απενεργοποιούν τα ένζυμα ανθεκτικότητας, καθιστώντας τα παράσιτα εξαιρετικά ευαίσθητα σε μικρές ποσότητες εντομοκτόνων, και (β) στην ανάπτυξη σύγχρονων μοριακών διαγνωστικών, τα οποία σε αντίθεση με τις κλασσικές βιοδοκιμές που διαπιστώνουν την ανθεκτικότητα μόνο σε προχωρημένα στάδια, συμβάλλουν στην έγκαιρη ανίχνευση της ανθεκτικότητας, ακόμα και πριν δημιουργηθεί το πρόβλημα, με αποτέλεσμα την πρόληψη και τη σωστή διαχείριση της χημικής καταπολέμησης. Η αυξανόμενη διασπορά των φαινομένων ανθεκτικότητας στα συνθετικά χημικά ακαρεοκτόνα, καθιστά επιτακτική την ανάγκη για ανάπτυξη φιλικών προς το περιβάλλον και τον χρήστη, βιοεντομοκτόνων με εκλεκτική δράση, στα πλαίσια της ολοκληρωμένης διαχείρισης εχθρών (IPM).

Τα βιοεντομοκτόνα αποτελούν εντομοκτόνα φυσικής προέλευσης (βακτήρια, μύκητες ή φυτικά εκχυλίσματα) που χρησιμοποιούνται για την εκλεκτική καταπολέμηση εντόμων ή παρασίτων. Στο 5^ο κεφάλαιο, αξιολογήθηκε η δράση βιοεντομοκτόνων έναντι του *Varroa destructor* και η μελισσοτοξική δράση αυτών σε συνθήκες εργαστηρίου. Πιο συγκεκριμένα, αξιολογήθηκαν εμπορικά εντομοκτόνα φυσικής προέλευσης, τα οποία προέρχονται από το «SuperPests» (SFS-17-2017), και επιλέχθηκαν τα πιο αποτελεσματικά για τη δράση τους έναντι του *Varroa destructor*. Επιλέχθηκαν πληθυσμοί Βαρρόα με βάση το προφίλ ευαισθησίας τους στα συνθετικά ακαρεοκτόνα και εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα των βιοεντομοκτόνων Prev-Am SL και Flipper EW έναντι του παρασίτου. Και τα δύο βιοεντομοκτόνα παρουσίασαν ικανοποιητική δράση έναντι του ευαίσθητου πληθυσμού αναφοράς, ενώ σε αντίστοιχα επίπεδα κινήθηκε η δραστηριότητα τους έναντι ενός πληθυσμού Βαρρόα ανθεκτικού στο οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο Coumaphos και ενός πληθυσμού που έφερε σε ομοζυγωτία τις σημειακές μεταλλάξεις L925I, που έχουν συσχετιστεί με ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή ακαρεοκτόνα. Στη συνέχεια μελετήθηκε η συνεργιστική δράση των δύο βιοεντομοκτόνων με το πυρεθροειδές ακαρεοκτόνο Flumethrin χωρίς ωστόσο να προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά που να αποδεικνύει συνέργεια. Απαραίτητη προϋπόθεση για την χρήση παρασιτοκτόνων ουσιών εντός της αποικίας μελισσών, αποτελεί η μελέτη ελέγχου τοξικότητας των ουσιών αυτών σε μέλισσες. Για το λόγο αυτό ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του OECD 214 (1998) με ορισμένες τροποποιήσεις. Η χρήση του συγκεκριμένου πρωτόκολλου ελέγχου οξείας τοξικότητας μέσω επαφής σε μέλισσες προσομοιώνει τη μέθοδο επέμβασης

που θα ακολουθηθεί εντός της κυψέλης σε μεταγενέστερο στάδιο. Και τα δύο βιοεντομοκτόνα που εξετάστηκαν, έδειξαν χαμηλά επίπεδα θνησιμότητας των μελισσών, που κυμάνθηκαν στα επίπεδα του μάρτυρα. Αντίθετα η χρήση θετικού μάρτυρα θανάτωσε το σύνολο των μελισσών που χρησιμοποιήθηκαν, επικαιροποιώντας την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας επιβεβαιώνουν τη δυνατότητα χρήσης εντομοκτόνων φυσικής προέλευσης σε προγράμματα διαχείρισης ανθεκτικότητας και ολοκληρωμένης διαχείρισης επιβλαβών οργανισμών (IPM). Η μελέτη αποτελεσματικότητας των βιοεντομοκτόνων έναντι του Βαρρόα και η αξιολόγηση της μελισσοτοξικής δράσης αυτών σε συνθήκες εργαστηρίου αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την διεξαγωγή επεμβατικών δοκιμών σε συνθήκες πεδίου.

Ο ρόλος των κυτοχρωμικών P450 μονοοξυγενασών (P450s) στα έντομα έχει μελετηθεί για τις φυσιολογικές λειτουργίες τους, αλλά και για το ρόλο τους στην αποτοξικοποίηση ξενοβιοτικών ουσιών, όπως φυσικών και συνθετικών εντομοκτόνων. Οι P450s ανήκουν σε υπεροικογένεια ενζύμων και εντοπίζονται στο σύνολο των αρθρόποδων οργανισμών, μεταξύ αυτών και το άκαρι *Varroa destructor*. Η δράση τους εντοπίζεται στη κατάλυση ξενοβιοτικών ουσιών μέσω οξειδωτικών διεργασιών. Σε αυτή τη δράση περιλαμβάνεται και η αποτοξικοποίηση εντομοκτόνων από ζωϊκούς εχθρούς που οδηγούν σε ανθεκτικότητα των οργανισμών αυτών στα εντομοκτόνα. Η αποτοξικοποίηση των εντομοκτόνων είχε συσχετιστεί συνήθως με αυξημένη έκφραση P450s εντός των οργανισμών στόχων, με αποτέλεσμα τον μεταβολισμό των εντομοκτόνων ουσιών σε αδρανές ουσίες που αποβάλλονταν από τον οργανισμό χωρίς να τον σκοτώνουν. Η εύρεση ενός νέου μηχανισμού ανθεκτικότητας του *Varroa destructor* στο προεντομοκτόνο Coumaphos, μέσω της μειωμένης έκφρασης στα ανθεκτικά ακάρεα, μιας P450 η οποία είναι υπεύθυνη για τη ενεργοποίηση του αρχικού μορίου στον τοξικό μεταβολίτη Coroxon, επαναπροσδιορίζει τον ρόλο των P450s στην τοξικολογία των εντόμων. Η κατανόηση του ρόλου των P450s μας επιτρέπει τη μελλοντική ανάπτυξη και χρήση τεχνικών γενετικών εργαλείων (CRISPR/Cas9) για τη διαχείριση του φαινομένου της ανθεκτικότητας τόσο σε επίπεδο P450s όσο και σε συνδυασμό με άλλους μηχανισμούς (Nauen et al. 2022). Επιπλέον, ο εντοπισμός γονιδίων ζωτικής σημασίας για τη λειτουργία των οργανισμών μας δίνει τη δυνατότητα ανάπτυξης RNAi εντομοκτόνων που στοχεύουν στα εν λόγω γονίδια των στόχων χωρίς τη πρόκληση αρνητικών επιπτώσεων σε ωφέλιμα έντομα και οργανισμούς (π.χ μέλισσες και επικονιαστές) (Fletcher et al. 2020).

Βιβλιογραφία

- Alissandrakis E., Ilias A., & Tsagkarakou A. (2016). Investigation of sodium-channel point mutations in Greek populations of the honeybee parasite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *European Association of Acarologists*.
- Alissandrakis E., Ilias A., & Tsagkarakou A. (2017). Pyrethroid target site resistance in Greek populations of the honey bee parasite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Journal of Apicultural Research*, 56(5), 625–630. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1368822>
- Andrews S. (2015). *Fast QC, A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data* (0.11.5). <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/%0Afastqc/>
- Aronstein K. A., Saldivar E., Vega R., Westmiller S., & Douglas A. E. (2012). How varroa parasitism affects the immunological and nutritional status of the honey bee, *Apis mellifera*. *Insects*, 3(3), 601–615. <https://doi.org/10.3390/insects3030601>
- Bailey J., Scott-Dupree C., Harris R., Tolman J., & Harris B. (2005). Contact and oral toxicity to honey bees (*Apis mellifera*) of agents registered for use for sweet corn insect control in Ontario, Canada. *Apidologie*, 36, 623–633. <https://doi.org/10.1051/apido:2005048>
- Beaurepaire A. L., Krieger K. J., & Moritz R. F. A. (2017). Infection, Genetics and Evolution Seasonal cycle of inbreeding and recombination of the parasitic mite *Varroa destructor* in honeybee colonies and its implications for the selection of acaricide resistance. *Infection, Genetics and Evolution*, 50, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.02.011>
- Berry J. A., Afik O., Nolan M. P. I. V., & Delaplane K. S. (2012). Revisiting powdered sugar for *Varroa* control on honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Apicultural Research*, 51(4), 367–368. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.51.4.14>
- Blacquièrè T., Altreuther G., & Krieger K. J. (2017). Evaluation of the Efficacy and Safety of Flumethrin 275 mg Bee-hive Strips (PolyVar Yellow®) against *Varroa destructor* in Naturally Infested Honey Bee Colonies in a Controlled Study. *Parasitology Research*, 116, 109–122. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5497-8>
- Boecking O., & Spivak M. (1999). Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, 30, 141–158.
- Bull D. L., & Ahrens E. H. (1988). Metabolism of coumaphos in susceptible and resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 25(2), 94–98. <https://doi.org/10.1093/jmedent/25.2.94>
- Campbell E. M., Budge G. E., & Bowman A. S. (2010). Gene-knockdown in the honey bee mite *Varroa destructor* by a non-invasive approach: Studies on a glutathione S-transferase. *Parasites and Vectors*, 3(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-73>
- Carrière Y. (2003). Haplodiploidy, Sex, and the Evolution of Pesticide Resistance. *Journal of Economic Entomology*, 96(6), 1626–1640. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-96.6.1626>
- Chandler D., Bailey A. S., Mark Tatchell G., Davidson G., Greaves J., & Grant W. P. (2011). The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1573), 1987–1998. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0390>
- Cremer S., Armitage S. A. O., & Schmid-Hempel P. (2007). Social Immunity. *Current Biology*, 17(16), 693–702. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.008>
- Daborn P. J., Yen J. L., Bogwitz M. R., Le Goff G., Feil E., Jeffers S., Tijet N., Perry T., Heckel D., Batterham P., Feyereisen R., Wilson T. G., & Ffrench-Constant R. H. (2002). A single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science*, 297(5590), 2253–2256. <https://doi.org/10.1126/science.1074170>

- DeGrandi-Hoffman G., & Chen Y. (2015). Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. *Current Opinion in Insect Science*, *10*, 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.05.007>
- Denholm I., Devine G. J., Horsberg T. E., Sevatdal S., Fallang A., Nolan D. V., & Powell R. (2002). Analysis and management of resistance to chemotherapeutants in salmon lice, *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae). *Pest Management Science*, *58*(6), 528–536. <https://doi.org/10.1002/ps.482>
- Dermauw W., Van Leeuwen T., & Feyereisen R. (2020). Diversity and evolution of the P450 family in arthropods. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *127*, 103490. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2020.103490>
- 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), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.03.012>
- Edgar R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, *32*(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- European Commission. (2020). Detailed information of honey production, national apiculture programmes, budget and legal bases.
- Evans J. D., Aronstein K., Chen Y. P., Hetru C., Imler J. L., Jiang H., Kanost M., Thompson G. J., Zou Z., & Hultmark D. (2006). Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, *15*(5), 645–656. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00682.x>
- Evans J. D., & Spivak M. (2010). Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, *103*(SUPPL. 1), S62–S72. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.019>
- FAO. (2015). *Varroa* mites (Varroatoxis or Varroosis).
- FAO. (2020). Good beekeeping practices: Practical manual on how to identify and control the main diseases of the honeybee (*Apis mellifera*).
- 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>
- Fletcher S. J., Reeves P. T., Hoang B. T., & Mitter N. (2020). A Perspective on RNAi-Based Biopesticides. *Frontiers in Plant Science*, *11*(February), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00051>
- Floris I., Cabras P., Garau V. L., Minelli E. V., Satta A., & Troullier J. (2001). Persistence and Effectiveness of Pyrethroids in Plastic Strips Against *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) and Mite Resistance in a Mediterranean Area. *Apiculture and Social Insects*, 806–810.
- Francis R. M., Nielsen S. L., & Kryger P. (2013). Varroa-Virus Interaction in Collapsing Honey Bee Colonies. *PLoS ONE*, *8*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057540>
- Fries I., & Camazine S. (2001). Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. *Apidologie*, *32*(3), 199–214. <https://doi.org/10.1051/apido:2001122>
- González-Cabrera J., Bumann H., Rodríguez-Vargas S., Kennedy P. J., Krieger K., Altreuther G., Hertel A., Hertlein G., Nauen R., & Williamson M. S. (2018). A single mutation is driving resistance to pyrethroids in European populations of the parasitic mite *Varroa destructor*. *Journal of Pest Science*, *91*, 1137–1144. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-0968-y>
- González-Cabrera J., Davies T. G. E., Field L. M., Kennedy P. J., & Williamson M. S. (2013). An amino acid substitution (L925V) associated with resistance to pyrethroids in *Varroa*

- destructor*. *PLoS ONE*, 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082941>
- González-Cabrera J.,Rodríguez-Vargas S.,Davies T. G. E.,Field L. M.,Schmehl D.,Ellis J. D.,Krieger K.,& Williamson M. S. (2016). Novel mutations in the voltage-gated sodium channel of pyrethroid-resistant *Varroa destructor* populations from the Southeastern USA. *PLoS ONE*, 11(5), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155332>
- GRASS Development Team. (2019). *Geographic Resources Analysis Support System (GRASS) Software (7.6)*. Open Source Geospatial Foundation. <https://grass.osgeo.org>
- Gregorc A. (2005). Efficacy of oxalic acid and apiguard against *Varroa* mites in honeybee (*Apis mellifera*) colonies. *Acta Veterinaria Brno*, 74(3), 441–447. <https://doi.org/10.2754/avb200574030441>
- Griffiths D. A.,& Bowman C. E. (1981). World Distribution of the Mite *Varroa Jacobsoni* , A Parasite of Honeybees. *Bee World*, 62(4), 154–163. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1981.11097839>
- Guillemaud T.,Raymond M.,Tsagkarakou A.,Bernard C.,Rochard P.,& Pasteur N. (1999). Quantitative variation and selection of esterase gene amplification in *Culex pipiens*. *Heredity*, 83(1), 87–99. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6885370>
- Guzov V. M.,Unnithan G. C.,Chernogolov A. A.,& Feyereisen R. (1998). CYP12A1, a mitochondrial cytochrome P450 from the house fly. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 359(2), 231–240. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0901>
- Hall T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95–98.
- Harizanis P. C. (1991). Infestation of queen cells by the mite *Varroa jacobsoni*. *Apidologie*, 22(5), 533–538. <https://doi.org/10.1051/apido:19910506>
- Havron A.,Rosen D.,Rossler Y.,& Hillel J. (1987). Selection on the male hemizygous genotype in arrhenotokous insects and mites. *Entomophaga*, 32(3), 261–268.
- Hemingway J.,& Karunaratne H. P. . (1998). Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Medical and Veterinary Entomology*, 12, 1–12. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.1998.00082.x>
- Hernández-Rodríguez C. S.,Moreno-Martí S.,Almecija G.,Christmon K.,Johnson J. D.,Ventelon M.,VanEngelsdorp D.,Cook S. C.,& González-Cabrera J. (2021). Resistance to amitraz in the parasitic honey bee mite *Varroa destructor* is associated with mutations in the β -adrenergic-like octopamine receptor. *Journal of Pest Science*, 0–2. <https://doi.org/10.1007/s10340-021-01471-3>
- Higes M.,Meana A.,Suárez M.,& Llorente J. (1999). Negative long-term effects on bee colonies treated with oxalic acid against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, 30(4), 289–292. <https://doi.org/10.1051/apido:19990404>
- Hubert J.,Nesvorna M.,Kamler M.,Kopecky J.,Tyl J.,Titera D.,& Stara J. (2014). Point mutations in the sodium channel gene conferring tau-fluvalinate resistance in *Varroa destructor*. *Pest Management Science*, 70(6), 889–894. <https://doi.org/10.1002/ps.3679>
- Humble J. L.,Carmona-Antoñanzas G.,McNair C. M.,Nelson D. R.,Bassett D. I.,Egholm I.,Bron J. E.,Bekaert M.,& Sturm A. (2019). Genome-wide survey of cytochrome P450 genes in the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer, 1837). *Parasites and Vectors*, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3808-x>
- Hung K. L. J.,Kingston J. M.,Albrecht M.,Holway D. A.,& Kohn J. R. (2018). The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1870). <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2140>
- Jeschke P. (2016). Propesticides and their use as agrochemicals. *Pest Management Science*,

- 72(2), 210–225. <https://doi.org/10.1002/ps.4170>
- Jonsson N. N., Miller R. J., & Robertson J. L. (2007). Critical evaluation of the modified-adult immersion test with discriminating dose bioassay for *Boophilus microplus* using American and Australian isolates. *Veterinary Parasitology*, 146(3–4), 307–315. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.02.031>
- Katsavou E., Riga M., Ioannidis P., King R., Zimmer C. T., & Vontas J. (2022). Functionally characterized arthropod pest and pollinator cytochrome P450s associated with xenobiotic metabolism. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 181(December 2021), 105005. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.105005>
- Katsavou E., Vlogiannitis S., Karp-Tatham E., Blake D. P., Ilias A., Strube C., Kioulos I., Dermauw W., Van Leeuwen T., & Vontas J. (2020). Identification and geographical distribution of pyrethroid resistance mutations in the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*. *Pest Management Science*, 76(1), 125–133. <https://doi.org/10.1002/ps.5582>
- Khajehali J., van Leeuwen T., Grispou M., Morou E., Alout H., Weill M., Tirry L., Vontas J., & Tsagkarakou A. (2009). Acetylcholinesterase point mutations in European strains of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) resistant to organophosphates. *Pest Management Science*, 66(2), 220–228. <https://doi.org/10.1002/ps.1884>
- Kita T., Hayashi T., Ohtani T., & Takao H. (2016). Amitraz and its metabolite differentially activate α - and β -adrenergic-like octopamine receptors. *Pest Management Science*, 73(5), 984–990. <https://doi.org/10.1002/ps.4412>
- Koc N., Inak E., Jonckheere W., & Van Leeuwen T. (2021). Genetic analysis and screening of pyrethroid resistance mutations in *Varroa destructor* populations from Turkey. *Experimental and Applied Acarology*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10493-021-00626-2>
- Konno T., Hodgson E., & Dauterman W. C. (1989). Studies on methyl parathion resistance in *Heliothis virescens*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 33(2), 189–199. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(89\)90009-6](https://doi.org/10.1016/0048-3575(89)90009-6)
- Kumar J., Ramlal A., Mallick D., & Mishra V. (2021). An overview of some biopesticides and their importance in plant protection for commercial acceptance. *Plants*, 10(6), 1–15. <https://doi.org/10.3390/plants10061185>
- Law C. W., Chen Y., Shi W., & Smyth G. K. (2014). Voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biology*, 15(2), 1–17. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r29>
- Leatherbarrow R. . (1992). *GraFit Version 3.0* (GraFit Version 3.0). Erithacus Software Ltd, Staines, UK.
- Lee S. H., Kang J. S., Min J. S., Yoon K. S., Strycharz J. P., Johnson R., Mittapalli O., Margam V. M., Sun W., Li H., Wu J., Kirkness E. F., Berenbaum M. R., Pittendrigh B. R., & Clark M. (2011). Decreased detoxification genes and genome size make the human body louse an efficient model to study xenobiotic metabolism. *Insect Molecular Biology*, 19(5), 599–615. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2010.01024.x>.Decreased
- Li A. Y., Davey R. B., Miller R. J., & George J. E. (2003). Resistance to coumaphos and diazinon in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) and evidence for the involvement of an oxidative detoxification mechanism. *Journal of Medical Entomology*, 40(4), 482–490. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.4.482>
- Liu N., & Pridgeon J. W. (2002). Metabolic detoxication and the kdr mutation in pyrethroid resistant house flies , *Musca domestica* (L .). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 73, 157–163. [https://doi.org/10.1016/S0048-3575\(02\)00101-3](https://doi.org/10.1016/S0048-3575(02)00101-3)

- Locke B. (2016). Natural Varroa mite-surviving *Apis mellifera* honeybee populations. *Apidologie*, 47(3), 467–482. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0412-8>
- Love M. I., Anders S., Kim V., & Huber W. (2015). RNA-Seq workflow: gene-level exploratory analysis and differential expression. *F1000Research*, 4, 1070. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7035.1>
- Maggi M. D., Damiani N., Ruffinengo S. R., Brasesco M. C., Szawarski N., Mitton G., Mariani F., Sammataro D., Quintana S., & Eguaras M. J. (2017). The susceptibility of *Varroa destructor* against oxalic acid: A study case. *Bulletin of Insectology*, 70(1), 39–44.
- Maggi M. D., Ruffinengo S. R., Damiani N., Sardella N. H., & Eguaras M. J. (2009). First detection of *Varroa destructor* resistance to coumaphos in Argentina. *Experimental and Applied Acarology*, 47(4), 317–320. <https://doi.org/10.1007/s10493-008-9216-0>
- Maggi M. D., Ruffinengo S. R., Gende L. B., Eguaras M. J., & Sardella N. H. (2008). LC50 baseline levels of amitraz, coumaphos, fluvalinate and flumethrin in populations of varroa destructor from buenos aires province, Argentina. *Journal of Apicultural Research*, 47(4), 292–295. <https://doi.org/10.1080/00218839.2008.11101477>
- Marrone P. G. (2019). Pesticidal natural products – status and future potential. *Pest Management Science*, 75(9), 2325–2340. <https://doi.org/10.1002/ps.5433>
- Martin S. J. (2004). *Acaricide (pyrethroid) resistance in Varroa destructor*. 85:4, 67–69. <https://doi.org/10.1080/0005772X.2004.11099632>
- Metcalf R. L. (1989). Insect resistance to insecticides. *Pest Management Science*, 26(4), 333–358. <https://doi.org/10.1002/ps.2780260403>
- Milani N. (1995). The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud to pyrethroids: a laboratory assay. *Apidologie*, 26(5), 415–429. <https://doi.org/10.1051/apido:19950507>
- Milani N., & Vedova G. Della. (2002). Decline in the proportion of mites resistant to fluvalinate in a population of *Varroa destructor* not treated with pyrethroids. *Apidologie*, 33, 417–422. <https://doi.org/10.1051/apido:2002028>
- Millán-Leiva A., Marín Ó., Christmon K., vanEngelsdorp D., & González-Cabrera J. (2021a). Mutations associated with pyrethroid resistance in *Varroa* mite, a parasite of honey bees, are widespread across the United States. *Pest Management Science*, 77(7), 3241–3249. <https://doi.org/10.1002/ps.6366>
- Millán-Leiva A., Marín Ó., De la Rúa P., Muñoz I., Tsagkarakou A., Eversol H., Christmon K., vanEngelsdorp D., & González-Cabrera J. (2021b). Mutations associated with pyrethroid resistance in the honey bee parasite *Varroa destructor* evolved as a series of parallel and sequential events. *Journal of Pest Science*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s10340-020-01321-8>
- Mozes-Koch R., Slabezki Y., Efrat H., Kalem H., Kamer Y., Yakobson B. A., Dag A., & Gerson U. (2000). First detection in Israel of fluvalinate resistance in the varroa mite using bioassay and biochemical methods. *Experimental and Applied Acarology*, 24(1), 35–43. <https://doi.org/10.1023/A:1006379114942>
- Nauen R., Bass C., Feyereisen R., & Vontas J. (2022). The Role of Cytochrome P450s in Insect Toxicology and Resistance. *Annual Review of Entomology*, 67, 105–124. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-070621-061328>
- O'Reilly A. O., Williamson M. S., González-Cabrera J., Turberg A., Field L. M., Wallace B. A., & Davies T. G. E. (2013). Predictive 3D modelling of the interactions of pyrethroids with the voltage-gated sodium channels of ticks and mites. *Pest Management Science*, 70(3), 369–377. <https://doi.org/10.1002/ps.3561>
- OECD. (1998). Guidelines for the Testing of Chemicals. *Guidelines for the Testing of Chemicals*,

- 214(April), 1–15. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264070561-en>
- Ogihara M. H., Kobayashi E., Morimoto N., Yoshiyama M., & Kimura K. (2021). Molecular analysis of voltage-gated sodium channels to assess τ -fluvalinate resistance in Japanese populations of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Applied Entomology and Zoology*, 56(2), 277–284. <https://doi.org/10.1007/s13355-020-00717-3>
- Oguh C. E., Okpaka C. O., Ubani C. S., Okekaji U., P.S. J., & Amadi E. U. (2019). View of Natural Pesticides (Biopesticides) and Uses in Pest Management- A Critical Review. *Asian Journal of Biotechnology and Genetic Engineering*, 2(3), 2(3): 1-18. <https://journalajbge.com/index.php/AJBGE/article/view/30063/56411>
- Papapostolou K.-M., Riga M., Charamis J., Skoufa E., Souchlas V., Ilias A., Dermauw W., Ioannidis P., Van Leeuwen T., & Vontas J. (2020). Identification and characterization of striking multiple-insecticide resistance in a *Tetranychus urticae* field population from Greece. *Pest Management Science*, 77(2), 666–676. <https://doi.org/10.1002/ps.6136>
- Pavela R. (2014). Acute, synergistic and antagonistic effects of some aromatic compounds on the *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lep., Noctuidae) larvae. *Industrial Crops and Products*, 60, 247–258. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.06.030>
- Peck D. T., & Seeley T. D. (2019). Mite bombs or robber lures? The roles of drifting and robbing in *Varroa destructor* transmission from collapsing honey bee colonies to their neighbors. *PLoS ONE*, 14(6), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218392>
- Pettis J. (2004). A scientific note of *Varroa destructor* resistance to coumaphos in the United States. *Apidologie*, 35, 91–92. <https://doi.org/10.1051/apido:2003060>
- Philbert A., Lyantagaye S. L., & Nkwengulila G. (2014). A Review of Agricultural Pesticides Use and the Selection for Resistance to Insecticides in Malaria Vectors. *Advances in Entomology*, 02(03), 120–128. <https://doi.org/10.4236/ae.2014.23019>
- Pimprale S. S., Besco C. L., Bryson P. K., & Brown T. M. (1997). Increased susceptibility of pyrethroid-resistant tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorfenapyr. *Journal of Economic Entomology*, 90(1), 49–54. <https://doi.org/10.1093/jee/90.1.49>
- Ramsey S. D., Ochoa R., Bauchan G., Gulbranson C., Mowery J. D., Cohen A., Lim D., Joklik J., Cicero J. M., Ellis J. D., Hawthorne D., & Van Engelsdorp D. (2019). *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(5), 1792–1801. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818371116>
- Riga M., Tsakireli D., Ilias A., Morou E., Myridakis A., Stephanou E. G., Nauen R., Dermauw W., Van Leeuwen T., Paine M., & Vontas J. (2014). Abamectin is metabolized by CYP392A16, a cytochrome P450 associated with high levels of acaricide resistance in *Tetranychus urticae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 46(1), 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.01.006>
- Rinkevich F. D., Leichter C. A., Lazo T. A., Hardstone M. C., & Scott J. G. (2013). Variable fitness costs for pyrethroid resistance alleles in the house fly, *Musca domestica*, in the absence of insecticide pressure. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 105(3), 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.01.006>
- Roberts J. M. K., Simbiken N., Dale C., Armstrong J., & Anderson D. L. (2020). Tolerance of Honey Bees to *Varroa* Mite in the Absence of Deformed Wing Virus. *Viruses*, 12, 1–12. <https://doi.org/10.3390/v12050575>
- Rosenkranz P., Aumeier P., & Ziegelmann B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(SUPPL. 1), S96–S119. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016>

- Sabourault C.,Guzov V. M.,Koener J. F.,Claudianos C.,Plapp F. W.,& Feyereisen R. (2001). Overproduction of a P450 that metabolizes diazinon is linked to a loss-of-function in the chromosome 2 ali-esterase (MdxE7) gene in resistant house flies. *Insect Molecular Biology*, 10(6), 609–618. <https://doi.org/10.1046/j.0962-1075.2001.00303.x>
- Santas L. A.,& Lazarakis D. M. (1984). Using drone brood in the control of the Varroa disease of bees in Greece. *Entomologia Hellenica*, 2, 63. <https://doi.org/10.12681/eh.13898>
- Scott J. G. (1999). Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(9), 757–777. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(99\)00038-7](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(99)00038-7)
- Sever H. C.,Heim J. R.,Lydy V. R.,Fung C. Y.,Huff Hartz K. E.,Giroux M. S.,Andrzejczyk N.,Major K. M.,Poynton H. C.,& Lydy M. J. (2020). Recessivity of pyrethroid resistance and limited interspecies hybridization across Hyalella clades supports rapid and independent origins of resistance. *Environmental Pollution*, 266, 115074. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115074>
- Song J.,Nagata K.,Tatebayashi H.,& Narahashi T. (1996). Interactions of tetramethrin , fenvalerate and D D T at the sodium channel in rat dorsal root ganglion neurons. 708(6), 29–37.
- Sparks T. C.,& Nauen R. (2015). IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.11.014>
- Stara J.,Pekar S.,Nesvorna M.,Erban T.,Vinsova H.,Kopecky J.,Dokocil I.,Kamler M.,& Hubert J. (2019). Detection of tau-fluvalinate resistance in the mite *Varroa destructor* based on the comparison of vial test and PCR–RFLP of kdr mutation in sodium channel gene. *Experimental and Applied Acarology*, 77(2), 161–171. <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00353-9>
- Tatebayashi H.,& Narahashi T. (1994). Differential Mechanism of Action of the Pyrethroid Tetramethrin on Tetrodotoxin-Sensitive and Tetrodotoxin-Resistant Sodium channels. *Pharmacology and Experimental Therapeutics*.
- Thomson H. M.,Brown M. A.,Ball R. F.,& Bew M. H. (2002). First report of *Varroa destructor* resistance to pyrethroids in the UK. *Apidologie*, 33, 357–366. <https://doi.org/10.1051/apido>
- Tijjani A.,Bashir K. A.,Muhammad A.,Mohammed I.,Gambo A.,& Musa H. (2016). Biopesticides for pests control: A review. *Journal of Biopesticides and Agriculture*, 3(1), 6–13. https://www.researchgate.net/publication/321075197_BIOPESTICIDES_FOR_PESTS_CONTROL_A_REVIEW
- Traynor K. S.,Mondet F.,de Miranda J. R.,Techer M.,Kowallik V.,Oddie M. A. Y.,Chantawannakul P.,& McAfee A. (2020). *Varroa destructor*: A Complex Parasite, Crippling Honey Bees Worldwide. *Trends in Parasitology*, 36(7), 592–606. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.04.004>
- Van Leeuwen T.,Van Pottelberge S.,& Tirry L. (2005). Comparative acaricide susceptibility and detoxifying enzyme activities in field-collected resistant and susceptible strains of *Tetranychus urticae*. *Pest Management Science*, 61(5), 499–507. <https://doi.org/10.1002/ps.1001>
- Van Leeuwen T.,Vontas J.,Tsagkarakou A.,Dermauw W.,& Tirry L. (2010). Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: A review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(8), 563–572. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.05.008>
- vanEngelsdorp D.,Evans J. D.,Saegerman C.,Mullin C.,Haubruge E.,Nguyen B. K.,Frazier

- M., Frazier J., Cox-Foster D., Chen Y., Underwood R., Tarpy D. R., & Pettis J. S. (2009). Colony collapse disorder: A descriptive study. *PLoS ONE*, 4(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006481>
- Vlogiannitis S., Mavridis K., Dermauw W., Snoeck S., Katsavou E., Morou E., Harizanis P., Swevers L., Hemingway J., Feyereisen R., van Leeuwen T., & Vontas J. (2021). Reduced proinsecticide activation by cytochrome P450 confers coumaphos resistance in the major bee parasite *varroa destructor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(6), 1–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.2020380118>
- Vlogiannitis S., Mavridis K., Morou E., Dermauw W., Van Leeuwen T., Harizanis P., & Vontas J. (2017). Characterization of acaricide resistance mechanisms of *Varroa* resistance in Greece. *17th Panhellenic Entomological Congress*.
- Vontas J. G., Small G. J., & Hemingway J. (2000). Comparison of esterase gene amplification, gene expression and esterase activity in insecticide susceptible and resistant strains of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Molecular Biology*, 9(6), 655–660. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2000.00228.x>
- Vontas J. G., Small G. J., & Hemingway J. (2001). Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochemical Journal*, 357(1), 65–72. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3570065>
- Williamson M. S., Denholm I., Bell C. A., & Devonshire A. L. (1993). Knockdown resistance (kdr) to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene locus in the housefly (*Musca domestica*). *Molecular Genetic and Genomics*, 17–22.
- Zhao M., Dong Y., Ran X., Guo X., Xing D., Zhang Y., Yan T., Zhu X., Su J., Zhang H., Wang G., Hou W., Wu Z., Li C., & Zhao T. (2014). Sodium channel point mutations associated with pyrethroid resistance in Chinese strains of *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasites and Vectors*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-369>
- Zhou C. song, Cao Q., Li G. zhi, & Ma D. ying. (2020). Role of several cytochrome P450s in the resistance and cross-resistance against imidacloprid and acetamiprid of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) MEAM1 cryptic species in Xinjiang, China. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 163(June), 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.11.017>
- Zhu K. Y., Lee S. H., & Clark J. M. (1996). A point mutation of acetylcholinesterase associated with azinphosmethyl resistance and reduced fitness in Colorado potato beetle. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 55(2), 100–108. <https://doi.org/10.1006/pest.1996.0039>
- Θρασυβούλου Α. (2005). Τριάντα χρόνια βαρρόα. *Μελισσοκομική Επιθεώρηση*, 19(4), 206–210.
- Θρασύβουλου Α., Τσέλιος Δ., Αδαμίδης Μ., Γκαλίτσιος Θ., & Μαυροδήμου Κ. (1998). Ανθεκτικότητα της βαρρόα στα φάρμακα. Οι πρώτες ενδείξεις. *Μελισσοκομική Επιθεώρηση*, 12(4), 173–177.
- Λιάκος Β. (1993). *Παθολογία των μελισσών*.
- Χαριζάνης Π. (2014). *Μέλισσας και μελισσοκομική τεχνική*.

Δημοσιεύσεις/Ανακοινώσεις της Διδακτορικής Διατριβής (ΔΔ)

Επιστημονικές δημοσιεύσεις σε περιοδικά με κριτές

- **Vlogiannitis S.**, Mavridis K., Wannes D., Snoeck S., Katsavou E., Morou E., Harizanis P., Swevers L., Hemingway J., Feyereisen R., Van Leeuwen T., Vontas J. (2021) Reduced proinsecticide activation by cytochrome P450 confers coumaphos resistance in the major bee parasite *Varroa destructor*. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* PNAS 118 (6) e2020380118; <https://doi.org/10.1073/pnas.2020380118>
- **Vlogiannitis S.**, Jonckheere W., Laget D., De Graaf D.C., Vontas J., & Van Leeuwen T. (2021). Pyrethroid target-site resistance mutations in populations of the honey bee parasite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) from Flanders, Belgium. *Experimental and Applied Acarology*, 85(2-4): 205-221. <https://doi.org/10.1007/s10493-021-00665-9>. IF=1.76

Ανακοινώσεις

Vlogiannitis S., Vontas J (2021) Resistance of, honey bee parasitic mite, Varroa to acaricides and development of novel Bio-insecticides without negative effects on bees. 4th Panhellenic Conference of Professional Beekeeping, 26-28 March 2022, Thessaloniki, Greece (προφορική ανακοίνωση).

- Van Leeuwen T., **Vlogiannitis S.**, Mavridis K, Dermauw W, Snoek S, Katsavou E, Morou E, Harizanis P, Swevers L, and Vontas J (2019) A novel mechanism confers high levels of coumaphos resistance in *Varroa destructor*. Entomology Society of America (ESA 2019), 17-20 November 2019, St. Luis, USA. (προφορική ανακοίνωση)
- Vontas J. **Vlogiannitis S.**, Mavridis K, Dermauw W, Snoek S, Katsavou E, Morou E, Harizanis P, Swevers L, and Van Leeuwen T. (2019) A novel mechanism confers high levels of coumaphos resistance in *Varroa destructor*. Resistance 2019, Rothamsted Research, 16-18 September 2019, Harpenden, Herts, UK. (προφορική ανακοίνωση)
- **Vlogiannitis S.**, Mavridis K, Dermauw W, Snoeck S, Katsavou E, Morou E, Harizanis P, Swevers L, Van Leeuwen T. and Vontas J (2019). Biochemical and molecular characterization of a striking coumaphos resistance mechanism in *Varroa destructor*. 18th Panhellenic Entomological Congress, 15-18 October 2019, Komotini, Greece. (εικονογραφημένη παρουσίαση)

- **Vlogiannitis S**, Mavridis K, Dermauw W, Snoeck S, Katsavou E, Morou E, Harizanis P, Swevers L, Van Leeuwen T. and Vontas J (2019). Biochemical and molecular characterization of a striking coumaphos resistance mechanism in *Varroa destructor*. 46th Apimondia International Apicultural Congress, 8-12 September 2019, Montreal, Canada. (εικονογραφημένη παρουσίαση)
- **Vlogiannitis S**, Mavridis K, Dermauw W, Kioulos I, Morou E, Van Leeuwen T. and Vontas J (2018) Monitoring acaricide resistance in *Varroa* and poultry red mite populations from Greece. XI European Congress of Entomology (ECE2018), 2-6 July, Naples, Italy. (εικονογραφημένη παρουσίαση)
- **Vlogiannitis S**, Mavridis K, Morou E, Dermauw W, Van Leewen T, Harizanis P, Vontas J. (2017) Characterization of acaricide resistance mechanisms of *Varroa* resistance in Greece. 17th Panhellenic Entomological Congress 18-22 September 2017, Agricultural University of Athens, Athens, Greece. (προφορική ανακοίνωση)

Δημοσιεύσεις σε εκλαϊκευμένα περιοδικά

Βλογιαννίτης Σπύρος, Μαυρίδης Κωνσταντίνος, Γκόρας Γεώργιος, Χαριζάνης Πασχάλης και Βόντας Ιωάννης (2021). Ανθεκτικότητα του παρασίτου της μέλισσας Βαρρόα στα παρασιτοκτόνα και σύγχρονες τάσεις στην ανάπτυξη βιοεντομοκτόνων χωρίς επιπτώσεις στις μέλισσες. Μελισσοκομική Επιθεώρηση, τεύχος 279, Σεπτέμβριος-Οκτώβριος 2021, 302-305.

Λοιπές Δημοσιεύσεις/Ανακοινώσεις

Επιστημονικές δημοσιεύσεις σε περιοδικά με κριτές

- Katsavou E, **Vlogiannitis S**, Karp-Tatham E, Damer B, Ilias A, Strube C, Kioulos I, Dermauw W, Van Leeuwen T, Vontas J. (2019) Identification and geographical distribution of the pyrethroid resistance mutations in the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*. Pest Management Science, Vol. 76, Issue 1, January 2020, 125-133; <https://doi.org/10.1002/ps.5582>

Ανακοινώσεις

- Katsavou E, **Vlogiannitis S**, Karp-Tatham E, Damer B, Kioulos I, Ilias A, Dermauw W, Van Leeuwen T, Vontas J (2019). Detection and molecular analysis of acaricide resistance in the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*. 8th International Symposium on Molecular Insect Science, 7-10 July 2019, Barcelona, Spain (προφορική ανακοίνωση)

Υπεύθυνη Δήλωση Υποψήφιου Διδάκτορος

Ο Υποψήφιος Διδάκτορας Βλογιαννίτης Σπυρίδων του Λεωνίδα δηλώνω ότι:
το υλικό της Διδακτορικής μου Διατριβής με τίτλο «Ανάλυση ανθεκτικότητας του ακάρεος *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) σε ακαρεοκτόνα και η ανάπτυξη εφαρμογών αντιμετώπισης, με χρήση βιοτεχνολογίας και βιοεντομοκτόνων»

1. είναι πρωτότυπο
2. δεν έχω προβεί σε λογοκλοπή ή κλοπή δεδομένων ή κλοπή εικόνων, σχεδίων ή γραφημάτων ή κλοπή σχημάτων, εικόνων, σχεδίων, γραφημάτων, σκίτσων ή φωτογραφιών
3. αναγνωρίζω ότι τα δεδομένα ανήκουν στο Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών
4. ο Επιβλέπων μπορεί μετά την παρέλευση τριετίας από την περάτωση της διατριβής μου, να χρησιμοποιήσει τα δεδομένα και τα αποτελέσματα κατά το δοκούν χωρίς την έγκρισή μου.

Ημερομηνία

17/04/2022



Υπογραφή

Δήλωση έργου Υποψήφιου Διδάκτορος

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

Ημερομηνία

17/04/2022



Υπογραφή