



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

Σχολή Γεωπονικών Επιστημών

Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**ΦΥΤΙΑΤΡΙΚΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ**

Ανταπόκριση ανθεκτικών πληθυσμών των ειδών *Culex ripiens* και *Aedes albopictus* σε εντομοκτόνα σε θερμοκρασιακές καταπονήσεις

**ΑΠΟΧΑ ΛΕΜΟΝΙΑ**

**ΒΟΛΟΣ 2022**

“ Ανταπόκριση ανθεκτικών πληθυσμών των ειδών *Culex pipiens* και *Aedes albopictus* σε εντομοκτόνα σε θερμοκρασιακές καταπονήσεις”

“Response of insecticide resistant populations of *Culex pipiens* and *Aedes albopictus* to thermal stress”

Απόχα Λεμονιά

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Νικόλαος Παπαδόπουλος, Καθηγητής, Εφαρμοσμένη Εντομολογία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπων)

Χρήστος Αθανασίου, Καθηγητής, Εντομολογία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Μέλος)

Χρήστος Νάκας, Καθηγητής, Βιομετρία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Μέλος)

Copyright © ΛΕΜΟΝΙΑ ΑΠΟΧΑ, 2022.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας διατριβής, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης.

Η έγκριση της Μεταπτυχιακής Διατριβής Ειδίκευσης από το Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δε δηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θεωρώ μεγάλη υποχρέωση να ευχαριστήσω τον εντιμότατο καθηγητή μου κ. Παπαδόπουλο Νικόλαο, Καθηγητή Εφαρμοσμένης Εντομολογίας του Εργαστηρίου Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τις χρήσιμες συμβουλές του, τις εύστοχες παρατηρήσεις του, αλλά κυρίως για την αστείρευτη υπομονή του.

Ευχαριστίες οφείλω στον Καθηγητή Εντομολογίας του Εργαστηρίου Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας, κ. Αθανασίου Χρήστο και στον Καθηγητή Βιομετρίας κ. Νάκα Χρήστο για την αξιολόγηση της εργασίας και για τις χρήσιμες συμβουλές τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Πολύτιμη υπήρξε επίσης η βοήθεια εκ μέρους του Δρ. Ιωάννου Χαράλαμπο Μεταδιδάκτορα του Εργαστηρίου Εντομολογίας για την εκπόνηση και αποπεράτωση της εργασίας καθώς επίσης και της Σαββίδου Ελένης μεταπτυχιακής φοιτήτριας. Ομολογώ με ευγνωμοσύνη ότι χωρίς την συνδρομή τους η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί.

Τέλος, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω τους καλούς μου γονείς και την αδερφή μου για την πολύτιμη βοήθειά τους και την αμέριστη συμπαράστασή τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα κουνούπια είναι διαβιβάστες πολλών ανθρώπινων ασθενειών συμπεριλαμβανομένης της ελονοσίας, του κίτρινου πυρετού, της εγκεφαλίτιδας και του δάγκειου πυρετού, επομένως η αντιμετώπισή τους αποτελεί μεγάλη ανάγκη για τη δημόσια υγεία, καθώς τα κουνούπια μεταδίδουν σοβαρές ανθρώπινες ασθένειες όπως η ελονοσία, η φιλαρίαση, ο δάγκειος πυρετός, ο κίτρινος πυρετός, ο ιός του Δυτικού Νείλου και ο ιός *chikungunya*. Στην Ελλάδα έχουν καταγραφεί 60 είδη κουνουπιών με 2 υποοικογένειες, 8 γένη (συμπεριλαμβανομένων των *Aedes* και *Culex*). Την τελευταία δεκαετία, έχει σημειωθεί ευρεία εξάπλωση του χωροκατακτητικού είδους κουνουπιού, *Aedes albopictus* -ασιατικό κουνούπι τίγρης- σε διάφορα αστικά οικοσυστήματα της Ελλάδας. Τα κουνούπια του γένους *Culex* (κοινό κουνούπι) είναι γενικά κατανεμημένα σε αστικά περιβάλλοντα σε όλο τον κόσμο, αλλά δεν είναι κοινά ή απουσιάζουν σε ακραία βόρεια τμήματα των εύκρατων ζωνών. Το γένος *Culex* αποτελείται από πολλά είδη, υποείδη, μορφές, φυλές, φυσιολογικές παραλλαγές ή βιοτύπους. Το *Cx. pipiens molestus* δεν διαχωρίζεται από το υποείδος *Cx. pipiens pipiens* και χαρακτηρίζεται ως βιότυπος, καθώς δεν έχουν βρεθεί γενετικές διαφορές

Οι υψηλότερες θερμοκρασίες αυξάνουν τον αναπαραγωγικό ρυθμό των εντόμων επομένως οι ρυθμοί αύξησης του πληθυσμού των εντόμων προβλέπεται να αυξηθούν. Οι επιδράσεις της θερμοκρασίας στη μετάδοση εξαρτώνται και από τα είδη διαβιβάστων και την αφθονία των παρασίτων. Η κλιματική αλλαγή έχει τη δυνατότητα να αυξήσει, να μειώσει ή να έχει ελαχιστοποιήσει την επίδραση στη μετάδοση ανάλογα με τις θερμικές αποκρίσεις του οργανισμού. Κύριος τρόπος καταπολέμησής τους είναι η εφαρμογή προνυμφοκτόνων όπως το diflubenzuron που παρεμβαίνει στην εναπόθεση χιτίνης και εμποδίζει τον σωστό σχηματισμό του νέου εξωσκελετού και την αποβολή του παλιού. Μια εναλλακτική λύση στα χημικά εντομοκτόνα είναι η χρήση τοξινών που παράγονται από το βακτήριο *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*). Μεγάλο μειονέκτημα αποτελεί η αύξηση του κόστους καταπολέμησης, καθώς απαιτούνται συχνότερες εφαρμογές και μεγαλύτερες δόσεις φυτοφαρμάκων για την καταστολή των πληθυσμών.

Στο εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, δημιουργήθηκαν πληθυσμοί των *Culex pipiens pipiens*, *Culex pipiens molestus* και *Ae. albopictus* οι οποίοι επιλέχθηκαν για ανθεκτικότητα τόσο στο DFB όσο και στο *Bti* για μια σειρά γενεών. Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, μελετήθηκε η ανταπόκριση ανθεκτικών και ευπαθών πληθυσμών στις δραστικές ουσίες Diflubenzuron και *Bacillus thuringiensis* subsp.

των παραπάνω εντόμων σε θερμικές καταπονήσεις. Επιπλέον μελετήθηκε πως ο εγκλιματισμός σε διαφορετικές θερμοκρασίες επάγει πλαστικότητα και συνεπώς δημιουργεί φαινότυπος με ιδιαίτερη ανταπόκριση στις συνθήκες καταπόνησης. Στα πειράματα υπέρψυξης στα ενήλικα που πραγματοποιήθηκαν και στα δύο γένη κουνουπιών, φάνηκε πως η επίδραση της ανθεκτικότητας δεν επηρέασε τις θερμοκρασίες υπέρψυξης. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύγκριση των αποτελεσμάτων των δύο βιοτύπων (*Cx. ripiens ripiens*, και *Cx ripiens molestus*) καθώς η διαφορά μεταξύ τους αγγίζει τους 10 °C. Κάτι αντίστοιχο φάνηκε και από τα πειράματα προσδιορισμού των κριτικών σημείων μέγιστων και ελάχιστων θερμοκρασιών (CTmax –CTmin). Τα άτομα που είχαν εγκλιματιστεί στους 15 °C υπήρχε εμφανείς διαφορά θερμοκρασίας περίπου 1,5 °C από εκείνο των ατόμου που είχαν εγκλιματιστεί στους 30 °C. Οι τιμές των αποτελεσμάτων και των δύο πειραμάτων επηρεάστηκαν από τη θερμοκρασία εγκλιματισμού και το φύλο, και από την επιλογή για ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα DFB και Bti στο *Cx. ripiens ripiens*. Οι τιμές του ήταν ελαφρώς υψηλότερες στον πληθυσμό που είχε δεχθεί επιλογή για ανθεκτικότητα στο *Bti*. Στο *Cx. ripiens molestus* οι τιμές επηρεάστηκαν από τη θερμοκρασία εγκλιματισμού όχι όμως από την επιλογή για ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα DFB και Bti κάτι το οποίο συνέβη και στο *Ae. albopictus*.

Επομένως φαίνεται αρκετά ρεαλιστικό το επικρατέστερο σενάριο μέχρι σήμερα που είναι η εξάπλωση των *Ae. albopictus* και *Cx. ripiens* προς μελλοντικά κατάλληλες περιοχές που αυτή τη στιγμή είναι απαλλαγμένες από τις ασθένειές τους, δεδομένων των κλιματικών συνθηκών που ευνοούν την εξάπλωσή τους, αλλά και την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα μέχρι τώρα χρησιμοποιούμενα σκευάσματα.

## SUMMARY

Mosquitoes are vectors of many human diseases including malaria, yellow fever, encephalitis and dengue, so their control is a major public health need as mosquitoes transmit serious human diseases such as malaria, filariasis, dengue fever, yellow fever, West Nile virus and chikungunya virus. In Greece, 60 species of mosquitoes with 2 subfamilies, 8 genus (including *Aedes* and *Culex*) have been recorded. In the last decade, there has been a widespread spread of the invasive mosquito species, *Aedes albopictus* - Asian tiger mosquito - in various urban ecosystems of Greece. Mosquitoes of the genus *Culex* (common mosquito) are generally distributed in urban environments around the world, but are uncommon or absent in extreme northern parts of temperate zones. The genus *Culex* consists of many species, subspecies, forms, races, physiological variants or biotypes. The *Cx. pipiens molestus* is not separated from the subspecies *Cx. pipiens pipiens* and is designated as a biotype, as no genetic differences have been found.

High temperatures increase the reproductive rate of insects so insect population growth rates are predicted to increase. The effects of temperature on transmission depend on both transmitter species and parasite abundance. Climate change has the potential to increase, decrease, or minimize the effect on transmission depending on the organism's thermal responses. The main way to combat them is the application of larvicides such as diflubenzuron which interferes with the deposition of chitin and prevents the proper formation of the new exoskeleton and the expulsion of the old one. An alternative to chemical insecticides is the use of toxins produced by the bacterium *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*). A major disadvantage is the increase in control costs, as more frequent applications and larger doses of pesticides are required to suppress populations.

In the Laboratory of Entomology and Agricultural Zoology of the University of Thessaly, populations of *Culex pipiens pipiens*, *Culex pipiens molestus* and *Ae. albopictus* which were selected for resistance to both DFB and Bti over a number of generations. In this master's thesis, the response of resistant and susceptible populations to the active substances Diflubenzuron and *Bacillus thuringiensis* subsp. of the above insects in thermal stresses. In addition, it was studied how acclimation to different temperatures induces plasticity and therefore creates a phenotype with a particular response to stress conditions. In adult supercooling experiments performed on both mosquito genera, it appeared that the hardiness effect did not affect supercooling temperatures. Of particular interest is the comparison of the results of the two biotypes (*Cx. pipiens pipiens*, and *Cx pipiens molestus*) as the difference between them reaches 10 °C. The

same results also seen from the experiments to determine the critical points of maximum and minimum temperatures (CT<sub>max</sub> –CT<sub>min</sub>). Individuals acclimated to 15 °C had an apparent temperature difference of approximately 1.5 °C from that of individuals acclimated to 30 °C. The values of the results of both experiments were affected by acclimation temperature and sex, and by selection for resistance to the insecticides DFB and Bti in *Cx. pipiens pipiens*. Its values were slightly higher in the population selected for resistance to Bti. In *Cx. pipiens molestus* values were affected by acclimation temperature but not by selection for resistance to DFB and Bti insecticides, which was also the case in *Ae. albopictus*.

Therefore, the prevailing scenario seems realistic, which is the spread of *Ae. albopictus* and *Cx. pipiens* to future suitable areas that are currently free of their diseases, given the climatic conditions that favor their spread, but also the development of resistance to the preparations used so far..



Εγώ, η Λεμονιά Απόχα, είμαι ο συγγραφέας αυτής της Μ.Δ.Ε. Αυτή η Μ.Δ.Ε. αντικατοπτρίζει την έρευνα που έγινε από εμένα και δεν έχει υποβληθεί (εξ ολοκλήρου ή μέρος της) σαν Μ.Δ.Ε. ή ως μέρος Διδακτορικής Διατριβής σε αυτό ή άλλο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών Ιδρυμάτων Τριτοβάθμιας Εκπαίδευσης του εσωτερικού ή εξωτερικού. Όποια συνεργασία καθώς και το μέγεθος αυτής δηλώνονται επακριβώς στο αντίστοιχο πεδίο αυτής της διατριβής. Επίσης έχω διαβάσει όλες τις βιβλιογραφικές αναφορές που παρατίθενται στο τέλος.

Ως επιβλέπων της έρευνας που περιγράφεται σε αυτή τη διατριβή, δηλώνω ότι όλοι οι όροι του Εσωτερικού Κανονισμού του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος έχουν τηρηθεί από την κα Λεμονιά Απόχα.

## Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
1.1 Το πιο επικίνδυνο πλάσμα στη γη .....	12
1.2 Κουνούπια, όχληση και μεταφορά ασθενειών .....	12
1.3 Είδη κουνουπιών στη Ελλάδα .....	15
1.3.1 Το ασιατικό κουνούπι τίγρης, <i>Aedes albopictus</i> .....	17
1.3.2 <i>Culex pipiens</i> .....	19
1.4 Η επίδραση της κλιματικής αλλαγής στα κουνούπια και τις ασθένειες που μεταδίδουν .....	21
1.5 Καταπολέμηση των κουνουπιών.....	23
1.5.1 Diflubenzuron (DFB) .....	24
1.5.2 <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> (Bti).....	25
1.6 Ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα.....	26
1.7 Σκοπός.....	27
2. ΥΑΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	28
2.1 Συνθήκες διατήρησης των πληθυσμών των κουνουπιών <i>Aedes albopictus</i> , <i>Culex pipiens pipiens</i> και <i>Culex pipiens molestus</i> . .....	28
2.2. Εφαρμογή του diflubenzuron (DFB) και του <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> (Bti). 30	
2.3 Πειράματα υπέρψυξης στα ενήλικα.....	30
2.4 Προετοιμασία πειραματικής διαδικασίας.....	32
2.4.1 Πειράματα προσδιορισμού των κριτικών σημείων μέγιστων και ελάχιστων θερμοκρασιών (CTmax –CTmin) .....	33
2.4.2 Προσδιορισμός αντοχής σε συνθήκες έλλειψης υγρασίας .....	34
2.4.3 Προσδιορισμός αντοχής σε συνθήκες έλλειψης τροφής .....	34
2.5 Στατιστική ανάλυση.....	35
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	36
3.1 Σημείο υπέρψυξης (Super cooling point) στα ενήλικα.....	36
3.2 Αποτελέσματα πειραμάτων προσδιορισμού των κριτικών σημείων ελάχιστων θερμοκρασιών (CTmin).....	43
3.3 Αποτελέσματα πειραμάτων προσδιορισμού των κριτικών σημείων μέγιστων θερμοκρασιών (CTmax) .....	51
4. Συζήτηση και Συμπεράσματα .....	57
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	61

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Το πιο επικίνδυνο πλάσμα στη γη

Στην ερώτηση « Ποιο είναι το πιο επικίνδυνο πλάσμα στη γη; » το Τμήμα Δημόσιας Υγείας της πολιτείας του Ιλινόι των ΗΠΑ απαντά με βεβαιότητα: « το κουνούπι » (Illinois Department of Public Health 2017). Ο Αμερικάνικος Οργανισμός Καταπολέμησης Κουνουπιών αναφέρει πως πάνω από ένα εκατομμύριο άνθρωποι παγκοσμίως πεθαίνουν από ασθένειες που μεταδίδονται από τα κουνούπια κάθε χρόνο.

Αλλά τα κουνούπια δεν θα έπρεπε να βρίσκονται στην κορυφή της λίστας των πιο επικίνδυνων «δολοφόνων», καθώς αποτελούν φορείς ασθενειών και δεν είναι ο κύριος σκοπός τους να σκοτώσουν (Prudêncio, 2020). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως τα κουνούπια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλά οικοσυστήματα ως κρίσιμοι επικονιαστές για πολλά φυτά και ως πηγή τροφής για μια σειρά ειδών όπως ψάρια, λιβελούλες, νυχτερίδες κ.α. (Bittel, 2016). Ερευνητές που παρακολούθησαν εντομοφάγα χελιδόνια σε ένα πάρκο στο “Camargue” της Γαλλίας, αφού η περιοχή ψεκάστηκε με έναν μικροβιακό παράγοντα αντιμετώπισης των κουνουπιών, διαπίστωσαν ότι γεννούσαν κατά μέσο όρο δύο νεοσσούς ανά φωλιά -αντί για τρεις- μετά τον ψεκασμό (Fang, 2010).

Παρ’ όλ’ αυτά, η αντιμετώπιση των κουνουπιών αποτελεί μεγάλη ανάγκη για τη δημόσια υγεία, καθώς τα κουνούπια μεταδίδουν σοβαρές ανθρώπινες ασθένειες όπως η ελονοσία, η φιλαρίαση, ο δάγκειος πυρετός, ο κίτρινος πυρετός, ο ιός του Δυτικού Νείλου και ο ιός *chikungunya* (Hemingway and Ranson, 2000).

### 1.2 Κουνούπια, όχληση και μεταφορά ασθενειών

Τα κουνούπια ανήκουν στην οικογένεια Culicidae, η οποία χωρίζεται σε 3 υποοικογένειες και 41 γένη. Οι υποοικογένειες Anophelinae και οι Culicinae τρέφονται με αίμα, αλλά η τρίτη, Toxorhynchitinae, όχι. Η υποοικογένεια Culicinae, που συμπεριλαμβάνει περίπου 3300 είδη, είναι μια σύνθετη ταξινομική ομάδα. Τα πιο κοινά γένη της είναι τα *Culex*, *Aedes*, *Ochlerotatus*, *Sabethes*, *Mansonia*, *Culiseta*, *Psorophora*, *Wyeomyia*, *Coquillettidia*, *Haemagogus* και *Armigeres*. Τα κουνούπια βρίσκονται σε όλο τον κόσμο, εκτός από την Ανταρκτική. Σε πολλά μέρη της κατανομής τους, ιδιαίτερα στις περιοχές της τούνδρας του βόρειου ημισφαιρίου, οι πληθυσμοί των κουνουπιών φθάνουν σε αναλογίες παρασίτων. Ωστόσο, η σημασία τους ως «παράσιτα» που προκαλούν όχληση είναι ασήμαντη σε σύγκριση με το ρόλο τους ως διαβιβαστές, ιδιαίτερα ανθρώπινων ασθενειών (Lehane, 2005).

Τα ενήλικα κουνούπια έχουν μήκος περίπου 5 mm, λεπτό σώμα, μακριά και επιμήκη πόδια, προεξέχοντα στοματικά μέρη που περικλείονται σε μια επιμήκη προβοσκίδα. Διαθέτουν μόνο ένα ζευγάρι λειτουργικών πτερύγων, το εμπρόσθιο. Τα οπίσθια φτερά έχουν εξελικτικά μετατραπεί σε αλτήρες. Όταν βρίσκονται σε στάση ανάπαυσης, κρατούν τα φτερά τους πάνω από την κοιλιά σαν ένα κλειστό ψαλίδι (Service, 2012). Οι τριχωτές κεραίες του αρσενικού είναι πιο θυσανωτές από αυτές του θηλυκού. Τα αρσενικά, και μερικές φορές τα θηλυκά, τρέφονται με νέκταρ. Τα περισσότερα θηλυκά χρειάζονται τουλάχιστον ένα γεύμα αίματος ώστε να ωριμάσουν τα αυγά τους. Τα αυγά αυτά εναποτίθεται στην επιφάνεια του νερού και εκκολάπτονται σε προνύμφες, που κολυμπούν με τιναχτές, στριφογυριστές κινήσεις και τρέφονται με φύκια και οργανικά κατάλοιπα (Larousse Britannica, 1991).

Τα ενήλικα κουνούπια και των δύο φύλων τρέφονται με ζαχαρούχα διαλύματα, αλλά μόνο τα θηλυκά και με αίμα. Τα κουνούπια ως ομάδα αιμομυζιτικών εντόμων τρέφονται με μια αρκετά σπονδυλωτά ζώα από ψάρια και ερπετά μέχρι πουλιά και θηλαστικά, αλλά κάθε είδος έχει τυπικά ένα στενό εύρος προτιμώμενων ξενιστών από τους οποίους τρέφεται (Lehane, 2005). Συγκεκριμένα είδη εντόμων που ρουφούν αίμα προτιμούν κάποιους ξενιστές περισσότερο από άλλους. Ορισμένα έντομα όταν τρέφονται με διαφορετικό είδος ξενιστή μπορεί να παρουσιάζουν μειωμένη γονιμότητα που προκαλείται από μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης, όχι τυπική αναλογία φύλων, μειωμένη πρόσληψη τροφής ή ρυθμό πέψης ή μειωμένη μακροζωία (Nelson et al., 1975). Το αίμα και τα συστατικά του αίματος επηρεάζουν τον σχηματισμό των αυγών και διαφέρουν ανάλογα με το σπονδυλωτό ζώο από το οποίο προήλθε (Harrison, 2021). Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το *Cx. pipiens*, το οποίο παράγαγε 82 αυγά  $\text{mg}^{-1}$  μετά από λήψη αίματος καναρινιού, σε σύγκριση με 40 αυγά  $\text{mg}^{-1}$  ανθρώπινου αίματος. Τα έντομα που ρουφούν το αίμα συνήθως λαμβάνουν γεύματα που αποτελούν μόνο ένα μικρό ποσοστό του συνολικού αίματος που υπάρχει στο ζώο ξενιστή. Αυτό ελαχιστοποιεί τις πιθανότητες να προσλάβει το έντομο οποιοδήποτε μεμονωμένο παράσιτο κατά τη διάρκεια της σίτισης.

Μια στρατηγική που υιοθετείται από τα εντομογενή παράσιτα για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα είναι η παραγωγή μεγάλου αριθμού μολυσματικών σταδίων που κυκλοφορούν στο αίμα του ξενιστή (Lehane, 2005). Τα θηλυκά κουνούπια μπορεί να πετάξουν από την περιοχή αναπαραγωγής τους αναζητώντας ένα γεύμα αίματος, αλλά τα αρσενικά συνήθως παραμένουν κοντά στην περιοχή αναπαραγωγής. Το εύρος πτήσης των θηλυκών ποικίλλει ανάλογα με το είδος, την εποχή του χρόνου, την κατεύθυνση του ανέμου και άλλους παράγοντες. Τα περισσότερα ενήλικα κουνούπια διασκορπίζονται μόνο 100-200 μέτρα από το σημείο «αναδυσής» τους (εξόδου από το νυμφικό περίβλημα). Ο άνεμος άνω των 6,4 km/h επιτρέπει

μόνο την κίνηση κατά του ανέμου και οι ταχύτητες άνω των 9,7 km/h εμποδίζουν την πτήση των περισσότερων ενηλικών (Robinson, 2005).

Η ανθρώπινη ελονοσία μεταδίδεται μόνο από τα θηλυκά είδων του γένους *Anopheles*. Από τα περίπου 430 είδη *Anopheles*, ενώ πάνω από 100 είναι γνωστό ότι μπορούν να μεταδώσουν ελονοσία στον άνθρωπο, μόνο 30-40 συνήθως τη μεταδίδουν (Elbers et al., 2015).

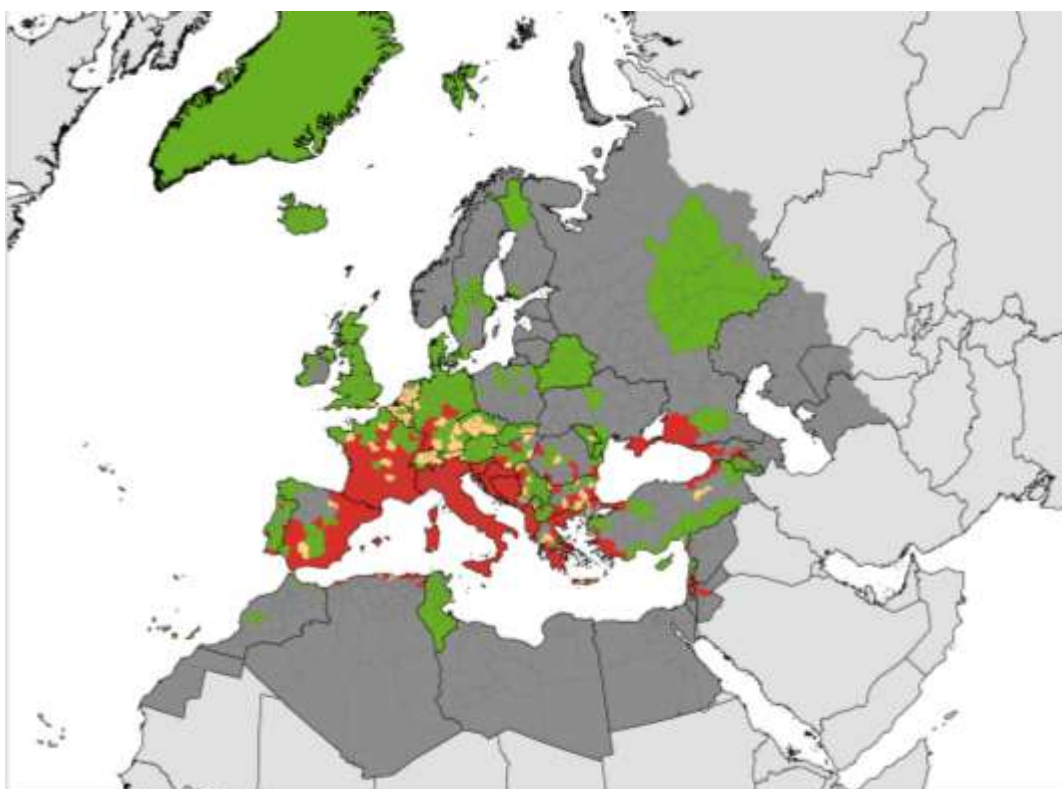
Το *Toxorhynchitinae*, που ονομάζεται επίσης κουνούπι ελέφαντας ή κουνουπιοφάγος, είναι ένα γένος ημερήσιων και συχνά σχετικά πολύχρωμων κουνουπιών. Τα περισσότερα είδη απαντώνται στα δάση. Περιλαμβάνει το μεγαλύτερο γνωστό είδος κουνουπιών, με μήκος έως 18 mm και άνοιγμα φτερών 24 mm. Είναι ανάμεσα στα πολλά είδη κουνουπιών που δεν καταναλώνουν αίμα. Τα ενήλικα τρέφονται με πηγές πλούσιες σε υδατάνθρακες, όπως μελίτωμα, ή χυμούς από φυτά, απορρίμματα, φρούτα και νέκταρ. Σε αντίθεση με τα είδη κουνουπιών που ρουφούν αίμα, οι προνύμφες τους θηρεύουν τις προνύμφες άλλων κουνουπιών καθιστώντας τα ωφέλιμα για τον άνθρωπο (Bonnet et al., 1951).

Τα κουνούπια είναι διαβιβαστές πολλών ανθρώπινων ασθενειών όπως αναφέρεται παραπάνω (Πίνακας 1), συμπεριλαμβανομένης της ελονοσίας, του κίτρινου πυρετού, της εγκεφαλίτιδας και του δάγκειου πυρετού. Είδη των γενών κουνουπιών *Aedes*, *Anopheles* και *Culex* εμφανίζονται σε αστικά ενδιαιτήματα (Robinson, 2005). Τουλάχιστον 20 είδη παθογόνων για την ελονοσία έχουν καταγραφεί στη Νότια Ασία, συμπεριλαμβανομένης της Ινδίας, του Πακιστάν, του Μπαγκλαντές και της Σρι Λάνκα. Τα πιο σοβαρά είδη που μεταδίδουν παθογόνα της ελονοσίας είναι τα *Anopheles stephensi*, *Anopheles sacharovi* και *Anopheles gambiae* (Abd, 2020). Τα κουνούπια μεταδίδουν περισσότερους από 200 αρβοϊούς στον άνθρωπο και άλλα ζώα, όπως ο δάγκειος πυρετός, ο οποίος είναι σε μεγάλο βαθμό μια αστική ασθένεια ενδημική σε πολλά μέρη της Νοτιοανατολικής Ασίας και του δυτικού Ειρηνικού, που εμφανίζεται επίσης στην Καραϊβική. Κύριος φορέας είναι το *Aedes aegypti*, με το *Aedes albopictus* να παίζει δευτερεύοντα ρόλο τουλάχιστον στην Ασία (Lehane 2005). Ο ιός του Δυτικού Νείλου έχει απομονωθεί από περισσότερα από 40 είδη κουνουπιών: τα πιο κοινά είναι τα είδη του γένους *Culex*, συμπεριλαμβανομένου του κοινού κουνουπιού *Cx. pipiens* και *Cx. univittatus*, *Cx. modestus*, *Cx. quinquefasciatus*, και *Cx. vishnui* (Robinson 2005). Τα Culicinae μεταδίδουν τα παράσιτα ελονοσίας όπως το *Plasmodium gallinaceum* σε άγρια και οικόσιτα πτηνά και μεταδίδουν επίσης αρβοϊούς που προκαλούν εγκεφαλίτιδα. (Lehane, 2005). Ο κίτρινος πυρετός, που είναι μια βραχυπρόθεσμη οξεία ασθένεια, συχνά προκαλεί θάνατο και ξεκινά με πυρετό, πονοκεφάλους και ίκτερο. Το χρώμα του ασθενούς γίνεται κίτρινο, μπορεί να εμφανιστεί εσωτερική αιμορραγία και έμετος και ο θάνατος μπορεί να επέλθει εντός 3

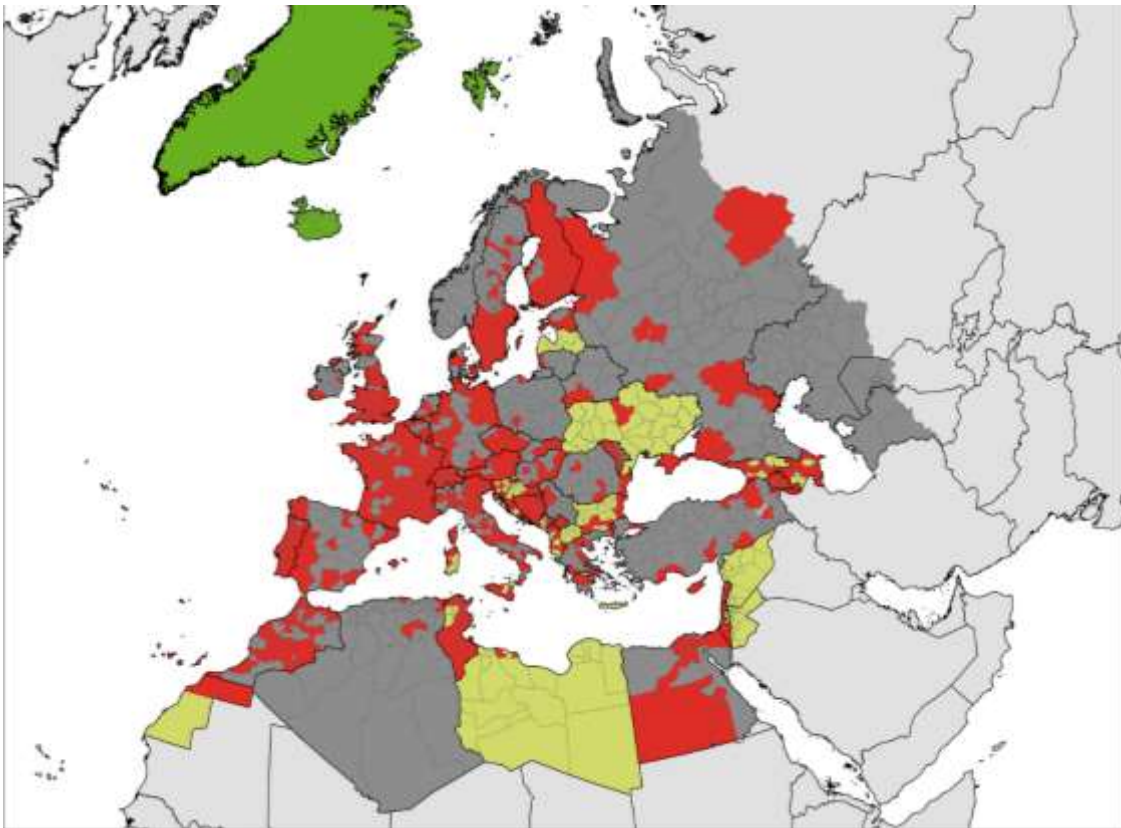
ημερών. Αυτός ο τύπος ασθένειας μεταδίδεται από τα κουνούπια *Culex* και *Aedes* (Abd, 2020).

### 1.3 Είδη κουνουπιών στη Ελλάδα

Σύμφωνα με μελέτες που διεξήχθησαν στην Ελλάδα έχουν καταγραφεί 60 είδη κουνουπιών με 2 υποοικογένειες, 8 γένη και 17 υπογένη. Στην Ελλάδα βρέθηκαν τα γένη *Aedes* (Εικόνα 1) και *Culex* (Εικόνα 2) (Samanidou and Darsie, 1993). Την τελευταία δεκαετία, έχει σημειωθεί ευρεία εξάπλωση του χωροκατακτητικού είδους κουνουπιού, *Ae. albopictus* -ασιατικό κουνούπι τίγρης- σε διάφορα αστικά οικοσυστήματα της Ελλάδας (Kolimenakis et al., 2019).



Εικόνα. Η τρέχουσα γνωστή κατανομή 1 του *Aedes albopictus* στην Ευρώπη: με κόκκινο χρώμα οι χώρες που έχει εγκατασταθεί, στο πράσινο έχει εισαχθεί και με κίτρινο δεν υπάρχει ακόμα (ECDC, Μάρτιος 2022).



Εικόνα 2. Η τρέχουσα γνωστή κατανομή του *Culex pipiens* στην Ευρώπη: με κόκκινο χρώμα οι χώρες που έχει εγκατασταθεί, στο πορτοκαλί έχει εισαχθεί και με πράσινο δεν υπάρχει ακόμα (ECDC Μάρτιος, 2022).

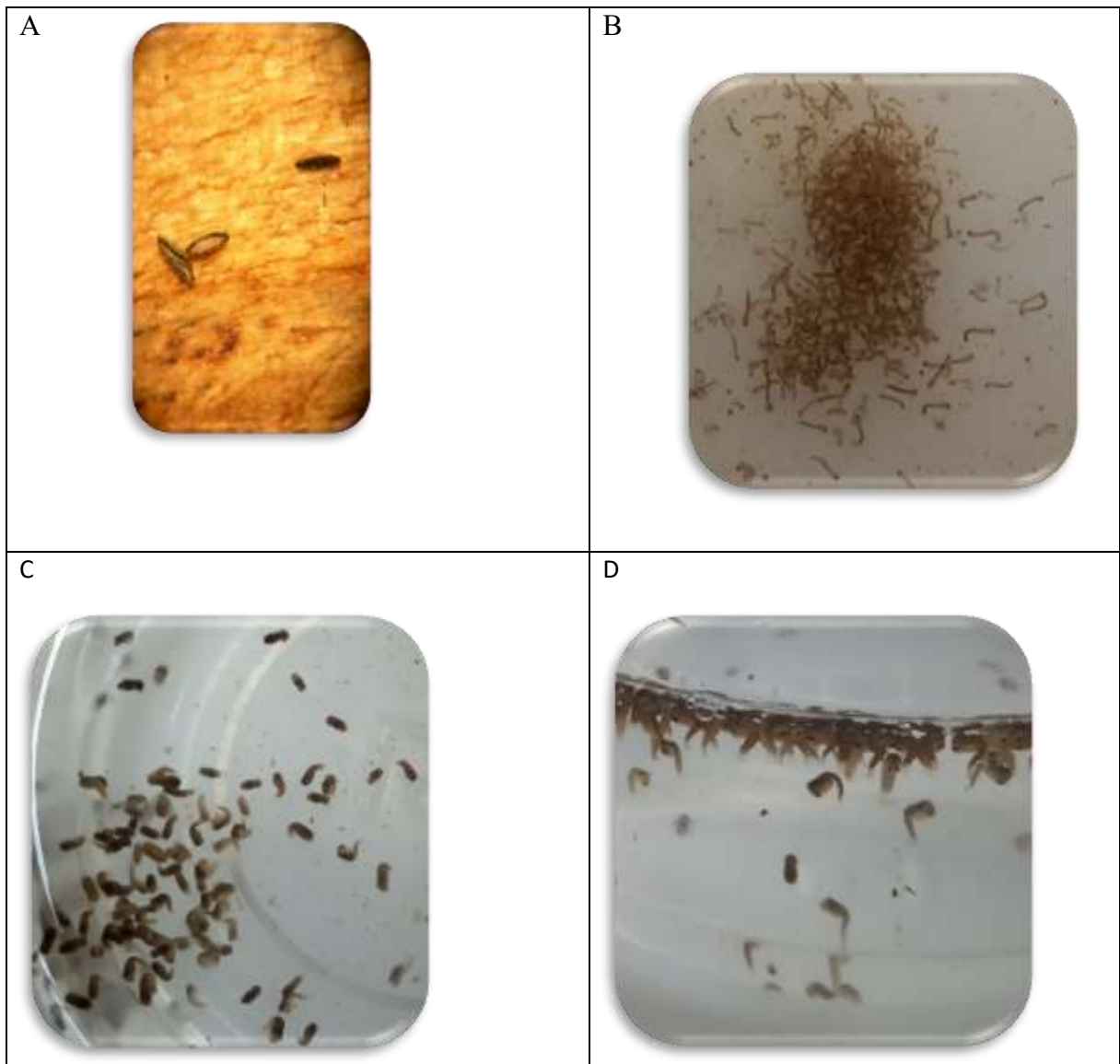
Πίνακας 1: Οι σημαντικότερες ασθένειες που διαβιβάζονται από το κοινό κουνούπι (*Culex pipiens*) και το ασιατικό κουνούπι τίγρης (*Aedes albopictus*)

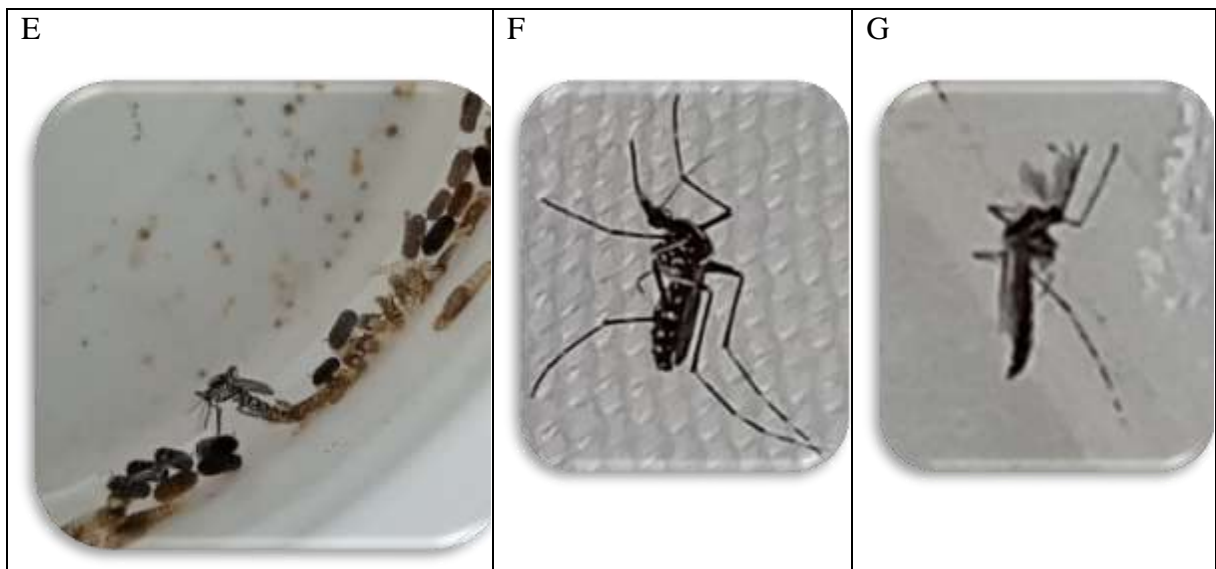
<i>Ασθένειες</i>	
<i>Culex pipiens</i>	<i>Aedes albopictus</i>
<i>West Nile Virus (WNV)</i>	<i>Chikungunya</i>
<i>Usutu virus (USUV)</i>	<i>Dengue</i>
<i>Rift Valley fever virus (RVFV)</i>	Zika
<i>Japanese encephalitis virus (JEV)</i>	<i>Dirofilariasis</i>
<i>Sindbis virus (SINV)</i>	
<i>Tahyna virus (TAHV)</i>	
<i>Avian malaria</i>	



### 1.3.1 Το ασιατικό κουνούπι τίγρης, *Aedes albopictus*

Το γένος *Aedes* κρατά το σώμα του παράλληλο προς την επιφάνεια του υποστρώματος, με την προβοσκίδα κεκαμμένη προς τα κάτω και μπορεί να αναγνωριστεί από τον ασημένιο θώρακά του με τις άσπρες κηλίδες και τις πίσω σπειροειδής σκληρές σμήριγγες. Οι πτέρυγες είναι χρωματικά ομοιόμορφες. Το άκρο της κοιλιάς του θηλυκού είναι μυτερό και διαθέτει αισθητήρια εξαρτήματα μέρος του γενετικού οπλισμού που εξέχουν. Οι κοντές βαρελόμορφες pronύμφες διαθέτουν ένα αναπνευστικό σιφώνιο που έχει ένα ζευγάρι θυσάνων. Συνήθως, οι pronύμφες κρέμονται με την κεφαλή προς τα κάτω. Συνήθως αναπαράγεται μετά από πλημμύρες σε δεξαμενές βρόχινου νερού ή σε αλατούχα έλη. Τα αυγά είναι ικανά να αντέξουν μακρές περιόδους ξηρασίας. Ο κύκλος ζωής (Εικόνα 3) κυμαίνεται, μπορεί να είναι τόσο σύντομος (10 μέρες) τη θερμή περίοδο του έτος ή μακρύς κατά την ψυχρή περίοδο και να διαρκέσει αρκετούς μήνες (Larousse Britannica, 1991).





Εικόνα 3 : Κύκλος ζωής του *Aedes albopictus* A. αυγό, B. προνύμφη, C, D.νύμφη, E. ενήλικο θηλυκό, F.ενήλικο αρσενικό.

Το γένος *Aedes* αποθέτει τα αυγά του σε υγρά υποστρώματα ακριβώς πάνω από την επιφάνεια του νερού. Αυτά τα αυγά, σε αντίθεση με αυτά που τοποθετούνται απευθείας στην επιφάνεια του νερού, σύντομα γίνονται ανθεκτικά στην ξηρασία και μπορούν να παραμείνουν βιώσιμα για πολλούς μήνες, καθυστερώντας την εκκόλαψή τους μέχρι να βυθιστούν στο νερό (Mullen and Durden, 2019). Ενώ η βύθιση είναι συνήθως το έναυσμα της εκκόλαψης, αυτά τα αυγά μπορούν επίσης να εισέλθουν σε διάπαυση, έτσι ώστε η εκκόλαψη να καθυστερήσει πέρα από την πρώτη βύθιση. Η διάπαυση των αυγών αποτελεί τον σημαντικότερο μηχανισμό διαχείμασης από τα κουνούπια αυτά σε εύκρατες περιοχές, ενώ άλλα είδη όπως εκείνα του γένους *Culex* διαχειμάζουν ως προνύμφες ή ως θηλυκά ενήλικα θηλυκά σε διάπαυση. Στις τροπικές περιοχές τα κουνούπια μπορεί να επιβιώσουν την ξηρή περίοδο ως αυγά ή περιστασιακά ως ενήλικα, αλλά στις περισσότερες περιοχές τα κουνούπια αναπαράγονται συνεχώς κατά τη διάρκεια της ξηρής περιόδου, αν και με πολύ μειωμένο ρυθμό (Lehane, 2005).

Στην Αίγυπτο η περίοδος της νύμφης του *Ae. albopictus* έχει υπολογιστεί στις 76 ώρες στους 20 °C, 53 ώρες στους 24,7 °C και 26-36 ώρες στους 30-33 °C. Τα ενήλικα έχουν μήκος 4–5,5 mm, χρώματος καφέ, με κίτρινο γύρω από τα μάτια και ο θώρακας και τα πόδια είναι καφέ. Τα αυγά στην Ασία και τις ΗΠΑ επιβιώνουν στους -10 °C για 24 ώρες. Η μέγιστη διάρκεια ζωής ενός αυγού είναι 243 ημέρες. Η ανάπτυξη των προνυμφών είναι περίπου 19 ημέρες στους 14 °C και των νυμφών είναι περίπου 4 ημέρες στους 15 °C. Στους 25 °C η ανάπτυξη της προνύμφης είναι 8 ημέρες και της νύμφης είναι 1 ημέρα. Στο εργαστήριο στους 25 °C και με επαρκή τροφή, η ανάπτυξη των προνυμφών είναι 5–10 ημέρες. Η ανάπτυξη παρατείνεται όταν

δεν υπάρχει αρκετή τροφή: 58 ημέρες για τα αρσενικά και 24 ημέρες για τα θηλυκά. Τα θηλυκά ζουν 4-8 εβδομάδες στο εργαστήριο στους 25 °C και το 30% των θηλυκών μπορεί να ζήσει 3-6 μήνες. (Robinson, 2005).

### 1.3.2 *Culex pipiens*

Τα κουνούπια του γένους *Culex* (κοινό κουνούπι) είναι γενικά κατανεμημένα σε αστικά περιβάλλοντα σε όλο τον κόσμο, αλλά δεν είναι κοινά ή απουσιάζουν σε ακραία βόρεια τμήματα των εύκρατων ζωνών. Ο θώρακας, τα πόδια και τα φτερά των ενηλίκων καλύπτονται ομοιόμορφα με καφέ λέπια, αλλά μερικά λευκά λέπια μπορεί να υπάρχουν στην κοιλιά (Robinson, 2005).

Το άκρο της κοιλιάς του θηλυκού είναι αμβλύ και φέρει συσταλτά αισθητήρια εξαρτήματα. Η προνύμφη του γένους *Culex*, κρατιέται λοξά σε σχέση με την επιφάνεια του νερού έχοντας το κεφάλι κάτω και προβάλλοντας ένα σιφώνιο. Εξίσου υδρόβιες και εφοδιασμένες με δύο αναπνευστικά σιφώνια στο πάνω μέρος του σώματος οι νύμφες είναι ικανές να μετακινούνται με ταχύτητα χτυπώντας το νερό με την ελαστική κοιλιά. Το ενήλικο άτομο βγαίνει από το νυμφικό κάλυμα από μία ραχιαία σχισμή και χρησιμοποιεί συχνά το νυμφικό κάλυμα ως σχέδια επίπλευσης πριν ξεκινήσει την χερσαία φάση της ζωής του και απομακρυνθεί από το υδάτινο περιβάλλον πετώντας. Η αναπαραγωγή των κουνουπιών του γένους *Culex* λαμβάνει χώρα σε οποιοδήποτε υδάτινο περιβάλλον γλυκού νερού, συμπεριλαμβανομένου του στάσιμου και μολυσμένου. Τα αυγά, επιπλέουν στο νερό συναθροίζονται σε μάζες (σχεδίες) των 100 ή περισσότερων. Ο βιολογικός κύκλος διαρκεί συνήθως 10-14 μέρες, μπορεί όμως να είναι μακρύτερος σε ψυχρότερα κλίματα.

Το γένος *Culex* αποτελείται από πολλά είδη, υποείδη, μορφές, φυλές, φυσιολογικές παραλλαγές ή βιοτόπους. Προς το παρόν περιλαμβάνει τα ονόματα *Cx. pipiens pipiens* Linnaeus (Εικόνες 4 και 5), *Cx. p. pipiens* βιότυπος *molestus* Forskal (Εικόνες 6 και 7), *Cx. p. quinquefasciatus* Say, *Cx. p. pallens* Coquillett, *Cx. restuans* Theobald και *Cx. torrentium* Martini στο Holarctic καθώς και δύο μέλη της Αυστραλίας, *Cx. australicus* Dobrotworsky and Drummond και *Cx. globocoxitus* Dobrotworsky. Το υποείδος *C. pipiens pipiens* είναι το πιο άφθονο στις νοτιότερες περιοχές (Larousse Britannica, 1991).

Το *Cx. ripiens molestus* δεν διαχωρίζεται από το υποείδος *Cx. ripiens ripiens* και χαρακτηρίζεται ως βιότυπος, καθώς δεν έχουν βρεθεί γενετικές διαφορές. Όμως νέα δεδομένα



Εικόνα 4: Ενήλικο θηλυκό κουνούπι του *Culex ripiens ripiens*



Εικόνα 5: Ενήλικα κουνούπια (θηλυκά κάτω, αρσενικό πάνω δεξιά) μαζί με νύμφες του *Culex ripiens ripiens*

με

βάση την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών αποκάλυψαν σημαντική γενετική απόσταση μεταξύ των δύο μορφών (Becker et al., 2003). Το *Cx. ripiens* είναι ένα μεμονωμένο πολυμορφικό είδος για το οποίο το *Cx. ripiens* και *Cx. quinquefasciatus* αναγνωρίστηκαν ως υποείδη και τα *Cx. molestus* και *Cx. pallens*, καθώς και το *Cx. comitatus* Dyar και Knab, πλέον συνώνυμο του *Cx. pallens*, αναγνωρίστηκαν ως υποείδη μορφές (Harbach, 2012).



Εικόνα 6: Ενήλικα θηλυκά του *Cx. ripiens molestus*



Εικόνα 7: Προνύμφες 4<sup>ου</sup> σταδίου. του *Cx. ripiens molestus*

Τα *Cx. pipiens* μπορούν να επιβιώσουν μερικές ημέρες στους 2–5°C, παρόλαυτα θερμοκρασίες του νερού κοντά στους 0 °C μπορεί να αποβούν μοιραίες. Η θερμοκρασία επηρεάζει την ανάπτυξη των προνυμφών. Η περίοδος της νύμφης είναι 2-3 ημέρες. Η ανάπτυξη διαρκεί 60 ημέρες στους 10 °C, 45 ημέρες στους 15 °C και 10 ημέρες στους 25 °C. Οι προνύμφες έχουν μήκος 7–8 mm (Mullen and Durden, 2019).

Τα αυγά (Εικόνα 8) τοποθετούνται σε μάζες ή σχεδίες στην επιφάνεια του νερού. Κάθε γεύμα αίματος συνήθως οδηγεί στην ανάπτυξη μιας παρτίδας περίπου 50-200 σκούρων-καφέ έως μαύρων ωοειδών αυγών. Το *Cx. pipiens molestus* μπορεί μία ή περισσότερες ομάδες αυγών να γίνουν αυτογενώς, αλλά η παραγωγή των επόμενων ωοτοκίων αυγών βασίζεται στη διατροφή με αίμα.



Εικόνα 8: Αυγά και προνύμφες 1<sup>ου</sup> σταδίου του *Cx. pipiens molestus*.

Τα *Cx. pipiens pipiens* και *Cx. pipiens molestus*

γεννούν τα αυγά τους σε ομάδες διατεταγμένες μαζί σε πλωτές σχεδίες. Σε τροπικές περιοχές αυτά τα αυγά εκκολάπτονται εντός τριών ημερών από την εναπόθεση (Mullen and Durden, 2019).

#### 1.4 Η επίδραση της κλιματικής αλλαγής στα κουνούπια και τις ασθένειες που μεταδίδουν

Η δραστηριότητα των κουνουπιών σχετίζεται με την θερμοκρασία και υγρασία του αέρα. Είναι μέγιστη το πρωί, το βράδυ και τη νύχτα σε πολλά είδη, αλλά στα υγρά και σκοτεινά δάση, τα κουνούπια είναι δραστήριο και τρέφονται όλη την ημέρα. Οι παγκόσμιες ατμοσφαιρικές θερμοκρασίες ολοένα και αυξάνονται πράγμα το οποίο από πολλούς θεωρείται ότι αντανakλά άμεσα και στις ασθένειες που μεταδίδονται από τα κουνούπια. Η πολυπλοκότητα όμως τόσο των φυσικών παραγόντων που σχετίζονται με το φαινόμενο του θερμοκηπίου όσο και η πολυπλοκότητα όλων των συμπεριφορικών και οικολογικών παραγόντων που επηρεάζουν τη μετάδοση των ασθενειών, καθιστούν αδύνατη την πρόβλεψη της επίδρασής τους στη συχνότητα εμφάνισης ασθενειών που μεταδίδονται από τα κουνούπια (Reiter, 2001). Δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως η φαινοτυπική και γονοτυπική διακύμανση στη θερμική αντοχή στους πληθυσμούς κουνουπιών, η περιβαλλοντική ευαισθησία της επιλογής και ο ρόλος της φαινοτυπικής πλαστικότητας για να υπάρξει μία ολοκληρωμένη εικόνα (Couper et. al., 2021).

Προσομοιώσεις μοντέλων υποδηλώνουν ότι οι υψηλότερες παγκόσμιες θερμοκρασίες θα ενισχύσουν τους ρυθμούς μετάδοσης ασθενειών μεταδιδόμενων από κουνούπια και θα επεκτείνουν τη γεωγραφική τους περιοχή, όμως οι ανθρώπινες δραστηριότητες εξακολουθούν

να παίζουν άμεσα πιο σημαντικό ρόλο από ότι το κλίμα (Reiter, 2001). Οι υψηλότερες θερμοκρασίες αυξάνουν τον αναπαραγωγικό ρυθμό των εντόμων της εύκρατης ζώνης, επομένως οι ρυθμοί αύξησης του πληθυσμού των εντόμων προβλέπεται να αυξηθούν (Adamo, et al. 2012). Η μετάδοση των ασθενειών ποικίλλει με τη θερμοκρασία, κορυφώνεται στους 23 - 29°C και μηδενίζεται κάτω από 9 - 23°C και πάνω από 32 - 38°C. Οι επιδράσεις της θερμοκρασίας στη μετάδοση εξαρτώνται και από τα είδη διαβιβαστών και την αφθονία των παρασίτων. Η κλιματική αλλαγή έχει τη δυνατότητα να αυξήσει, να μειώσει ή να έχει ελαχιστοποιήσει την επίδραση στη μετάδοση ανάλογα με τις θερμικές αποκρίσεις του οργανισμού (Mordecai et al., 2019).

Η διακύμανση της θερμοκρασίας μειώνει τις διαδικασίες ρυθμού όπως η ανάπτυξη. Η γενίκευση αυτών των επιπτώσεων για μια σειρά από χερσαία έντομα αποκαλύπτει ότι οι επικρατούσες καθημερινές διακυμάνσεις της θερμοκρασίας θα πρέπει να αλλάξουν την ευαισθησία των ειδών στην υπερθέρμανση του κλίματος μειώνοντας τα «περιθώρια θερμικής ασφάλειας» (Paaijmans et al., 2013). Τα χαρακτηριστικά των κουνουπιών και των παθογόνων που σχετίζονται με την επιβίωση, την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή είναι ευαίσθητα στη θερμοκρασία. Η κλιματική αλλαγή θα επηρεάσει πολλά κουνούπια και παθογόνα γνωρίσματα που διέπουν την κατανομή, την αφθονία και τη μετάδοση των κουνουπιών (Mordecai et al., 2019).

Μια σημαντική αύξηση στην εξάπλωση των χωροκατακτητικών κουνουπιών έχει παρατηρηθεί στην Ευρώπη από τα τέλη τις δεκαετίας του 1990, με το ασιατικό κουνούπι τίγρης *Ae. albopictus* να επεκτείνει συνεχώς την γεωγραφική του εξάπλωση. Μέχρι σήμερα το *Ae. albopictus* έχει αποικίσει σχεδόν τις Μεσογειακές χώρες, ενώ το ασιατικό κουνούπι *Aedes japonicus* εξαπλώνεται ευρέως στην Κεντρική Ευρώπη. Δύο άλλα είδη, το *Aedes atropalpus* και το *Aedes koreicus*, έχουν εισαχθεί σε αρκετές περιπτώσεις, οδηγώντας στην εγκατάσταση πληθυσμών σε λίγες εστίες. Τέλος, το κουνούπι που μεταφέρει αποτελεσματικά τον κίτρινο πυρετό, *Aedes aegypti* (Εικ. 3), το οποίο είχε εισαχθεί στην Ευρώπη κατά τον 17ο-19ο αιώνα, υπήρχε στη νότια Ευρώπη μέχρι την εξαφάνισή του κατά τον 20ο αιώνα. Αυτό το είδος φαίνεται να έχει πλέον επιστρέψει, έχοντας πρόσφατα εγκατασταθεί στη Μαδέρα της Πορτογαλίας καθώς και γύρω από τις ακτές της Μαύρης Θάλασσας (Ρωσία, Αμπχαζία, Γεωργία). Αυτά τα είδη κουνουπιών εισβολείς είναι καλά προσαρμοσμένα σε “συνανθρωπικά” περιβάλλοντα όπου εκμεταλλεύονται τις άφθονες πηγές αίματος του ξενιστή, τους χώρους ανάπαυσης και τους χώρους αναπαραγωγής προνυμφών (κυρίως δοχεία νερού) (Schaffner et al., 2013).

### 1.5 Καταπολέμηση των κουνουπιών

Η πρόληψη των ασθενειών που μεταδίδονται από τα κουνούπια, καθώς και η αυξημένη όχληση που προκαλούν τα κουνούπια, η οποία επηρεάζει αρνητικά την ποιότητα ζωής και την ανάπτυξη του τουρισμού, βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στην εφαρμογή προγραμμάτων αντιμετώπισης των κουνουπιών που χρησιμοποιούν χημικές, μηχανικές και βιολογικές παρεμβάσεις, διαχείριση πληθυσμών φορέων (Becker et al., 2010).

Μερικές φορές αναφέρεται ως μηχανικός ή περιβαλλοντικός έλεγχος των πληθυσμών των κουνουπιών και η συμπλήρωση/αποστράγγιση. Συνιστά στην πλήρωση και κατά συνέπεια στην πλήρη εξάλειψη των τόπων αναπαραγωγής. Τα ενδαιτήματα προνυμφών, που κυμαίνονται σε μέγεθος από τρύπες δέντρων γεμάτες με νερό μέχρι λίμνες και μικρά έλη, μπορούν να γεμίσουν με αδρανή υλικά όπως χώμα ή άμμο (Service, 2012).

Για την αντιμετώπιση των ενήλικων κουνουπιών μπορούν να χρησιμοποιηθούν μηχανοκίνητοι ανεμιστήρες ομίχλης, θερμικοί θολωτοί μηχανισμοί ή μηχανές που παράγουν εντομοκτόνα αερολύματα. Οι ομίχλες παράγονται όταν πολύ λεπτά σωματίδια αερολύματος (5- 15m) είναι τόσο πολυάριθμα που μειώνουν σημαντικά την ορατότητα. Ενδοφιλικά είδη μπορούν επίσης να θανατωθούν από τα νέφη αυτά. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα εντομοκτόνα, μαλαθείο, φενιτροθειό, πιριμίνο-μεθύλιο και πυρεθροειδή.

Στην Ευρώπη, οι χημικές παρεμβάσεις χρησιμοποιούνται πιο συχνά και βασίζονται κυρίως στη χρήση βιοκτόνων κατά των προνυμφών κουνουπιών, όπως οργανοφωσφορικά, βιολογικά εντομοκτόνα όπως σκευάσματα βάκιλου θουριγίας (*Bacillus thuringiensis*) (*Bti*) και ρυθμιστές ανάπτυξης (Insect growth regulators, IGRs) όπως το diflubenzuron. Βιοκτόνα για τον έλεγχο των ενήλικων κουνουπιών, όπως τα πυρεθροειδή είναι επίσης διαθέσιμα και εφαρμόζονται στους εσωτερικούς χώρους ή σε εξωτερικούς χώρους ή/και σε μέρη όπου τα ενήλικα κουνούπια ξεκουράζονται ή αναζητούν πηγή τροφής (Fotakis et al., 2017). Η καταπολέμηση θα πρέπει να στηρίζεται κυρίως στην προνυμφοκτονία, αλλά και στην εφαρμογή μέτρων διαχείρισης του περιβάλλοντος για τον περιορισμό των εστιών ανάπτυξης των κουνουπιών. Σε επείγουσες και σοβαρές περιπτώσεις για λόγους προστασίας της δημόσιας υγείας, μπορεί να πραγματοποιηθεί καταπολέμηση των τέλειων εντόμων (Υπουργείο Υγείας, 2020).

Τα εγκεκριμένα προνυμφοκτόνα σκευάσματα, σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΕ) 528/2012, για την αντιμετώπιση των κουνουπιών στη χώρα μας, είναι ο βιολογικός παράγοντας *Bacillus thuringiensis* (*Bti*) με εγκεκριμένα σκευάσματα το VECTOBAC 12 AS (Αρ. έγκρισης: ΤΠ18-0246) και VECTOBAC 200G (Αρ. έγκρισης: ΤΠ18-0293) και ο ρυθμιστής ανάπτυξης (IGR

εντομοκτόνο) diflubenzuron με εγκεκριμένα σκευάσματα το DU-DIM 15 SC, DU-DIM 2 DT και DU-DIM 2 GR (ΥΠΙΑΑΤ 2020).

Τα βιοκτόνα είναι απαραίτητα εργαλεία για την πρόληψη ασθενειών, αλλά ένα σημαντικό πρόβλημα που σχετίζεται με την εντατική χρήση τους είναι η ανάπτυξη αντοχής στα εντομοκτόνα. Σε σχετικές πρόσφατες δημοσιεύσεις από όλη την Αφρική, η υψηλότερη αντοχή στους πληθυσμούς των κουνουπιών συνδέθηκε με τη χρήση γεωργικών εντομοκτόνων. Αυτή η συσχέτιση φαίνεται να επηρεάζεται από τον τύπο της καλλιέργειας, τη στρατηγική διαχείρισης παρασίτων στο αγρόκτημα και την αστική ανάπτυξη (Reid and McKenzie, 2016)

### 1.5.1 Diflubenzuron (DFB)

Οι ενώσεις της βενζοϋλφαινυλουρίας, όπως το cryomazin, diflubenzuron, flufenoxuron, flufenuron, hexaflumuron, noviflumuron και triflumuron, παρεμβαίνουν στην εναπόθεση χιτίνης και εμποδίζουν τον σωστό σχηματισμό του νέου εξωσκελετού και την αποβολή του παλιού. Αυτές οι ενώσεις μπορεί να έχουν ωοκτόνο δράση διαταράσσοντας το σχηματισμό της επιδερμίδας στα αναπτυσσόμενα έμβρυα και συνεπώς δεν επιτρέπουν την ολοκλήρωση της ανάπτυξης και προφανώς της εκκόλαψης των προνυμφών (Robinson, 2005). Η εφαρμογή τους απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή, διότι ορισμένες από τις ουσίες αυτές παρά την μικρή οξεία τοξικότητά τους στα ποντίκια, είναι βλαβερές σε υδρόβιους οργανισμούς. Είναι προφανές ότι όσες εντομοκτόνες ουσίες εισέρχονται στο σώμα των εντόμων και με επαφή, μπορεί να βλάψουν και ωφέλιμα έντομα (Τζανακάκης, 1995).

Το πρώτο εντομοκτόνο της ομάδας των βενζουλουριών ήταν το diflubenzuron που εισάχθηκε στη γεωργική πράξη το 1975 με το εμπορικό όνομα Dimilin. Είναι εκλεκτικό μη διασυστηματικό εντομοκτόνο επαφής και στομάχου. Είναι αποτελεσματικό και εναντίων προνυμφών μυγών, κουνουπιών και μεταναστευτικών ακρίδων, καθώς και για τον έλεγχο εκτοπαρασίτων (ψείρες, ψύλλοι κ.α.) των παραγωγικών ζώων. Λόγο της εκλεκτικότητας και της γρήγορης αποδόμησής του στο έδαφος και το νερό δεν έχει σημαντικές επιδράσεις σε ωφέλιμα έντομα (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2017).

Το diflubenzuron αναστέλλει τη διαδικασία βιοσύνθεσης χιτίνης αλληλεπιδρώντας άμεσα με το ένζυμο χιτίνης συνθάσης 1 (CHS1) που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση χιτίνης στην επιδερμίδα του εντόμου. Δύο μεταλλάξεις (I1043L και I1043M) στην υποτιθέμενη θέση δέσμευσης της συνθάσης χιτίνης (CHS) του DFB έχουν αναφερθεί προηγουμένως στο *Cx. ripiens* από την Ιταλία και συνδέονται με υψηλά επίπεδα αντοχής σε αυτό το προνυμφοκτόνο. (Fotakis, 2020).



Μια τρίτη μετάλλαξη εντοπίστηκε πρόσφατα στην Ιταλία και σχετίζεται με υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στο DFB. Αυτή η μετάλλαξη ανιχνεύθηκε επίσης στη Γαλλία, ενώ δεν βρέθηκαν μεταλλάξεις στο *Cx. pipiens* από την Ελλάδα, την Πορτογαλία και το Ισραήλ. Τα παραπάνω ευρήματα προκαλούν μεγάλη ανησυχία για τα προγράμματα καταπολέμησης των κουνουπιών στη Νότια Ευρώπη, τα οποία βασίζονται στη χρήση περιορισμένου αριθμού προνυμφοκτόνων (Fotakis, 2020).

Μια διαγνωστική δοκιμασία αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR-RFLP και μια ειδική ανάλυση αλληλουχίας PCR έχουν αναπτυχθεί για να ταυτοποιηθούν οι μεταλλάξεις I1043M και I1043L αντίστοιχα και το 2017 η κατανομή και η συχνότητα των δύο μεταλλάξεων DFB καταγράφηκαν σε πληθυσμούς *Cx. pipiens* από την περιοχή Romagna, Βόρεια Ιταλία. Το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο I1043L ανιχνεύθηκε σε 20 από τους 30 πληθυσμούς *Cx. pipiens* σε συχνότητα αλληλόμορφων που κυμαίνεται από 4 έως 60%, ενώ το I1043M ανιχνεύθηκε μετάλλαξη σε 10 από τους 30 πληθυσμούς με συχνότητα που κυμαίνεται από 8 έως 77,1%. Η παρουσία και η κατανομή της μετάλλαξης ήταν εστιακή (ευδιάκριτα υψηλότερες συχνότητες μετάλλαξης ήταν καταγράφηκε στις ανατολικές επαρχίες) Υψηλές συχνότητες μετάλλαξης DFB (I1043L, I1043M), που φτάνουν σε συχνότητα 52,7% αναφέρθηκαν πρόσφατα επίσης σε δείγματα πληθυσμών του *Cx. pipiens* που ελήφθησαν το 2016 από την επαρχία Mugla, στη δυτική Τουρκία Αντίθετα, δεν καταγράφηκαν ανθεκτικές μεταλλάξεις σε δείγματα που αναλύθηκαν από την Ελλάδα και τη Γαλλία. Τα ευρήματα από την Ιταλία και την Τουρκία είναι ανησυχητικά και μείζονος σημασίας για τη δημόσια υγεία, υπογραμμίζοντας την ανάγκη για συστηματική παρακολούθηση της αντοχής στο DFB σε πληθυσμούς φορείς στην Ευρώπη, απαραίτητη προϋπόθεση για το σχεδιασμό και την εφαρμογή κατάλληλων στρατηγικών διαχείρισης της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα (Merzendorfer, 2012).

### **1.5.2 *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti)**

Η μαζική χρήση χημικών εντομοκτόνων οδήγησε σε ανεπιθύμητη τοξικότητα σε οργανισμούς μη στόχους και στην επιλογή μηχανισμών αντοχής στα εντομοκτόνα σε πληθυσμούς κουνουπιών. Μια εναλλακτική λύση στα χημικά εντομοκτόνα είναι η χρήση τοξινών που παράγονται από το βακτήριο *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) (Robinson, 2005). Το *B. thuringiensis* που παράγει πρωτεϊνικές ενδοτοξίνες (δ-ενδοτοξίνες), μεγέθους 60-70Kd, και νουκλεϊνικές εξωτοξίνες, οι οποίες θανατώνουν το έντομο και χωρίς την παρουσία του βακτηρίου. Το *Bti*, που παράγει επίσης τέσσερις ενδοτοξίνες (Cry 4a, Cry 4b, Cry 11a, Cyt 1A), χρησιμοποιείται από το 1938 ως προνυμφοκτόνο για την καταπολέμηση κουνουπιών και

αλλά και για την καταπολέμηση εντόμων γεωργικής σημασίας (Τζανακάκης 1995, Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2017).

Το δραστικό στοιχείο του είναι τα σπόριά του και οι πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι, που σχηματίζονται κατά την παραγωγή των σπορίων. Κατά την κατάποση τροφής που περιέχει σπόρια ή κρυστάλλους του βακίλου, οι πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι διασπώνται σε μία τοξική για το έντομο πρωτεΐνη (Margalit and Dean, 1985).

Ανθεκτικότητα στο *Bti* δεν έχει αναφερθεί ακόμα στο ύπαιθρο και αυτό είναι πιθανό να οφείλεται στις πολλαπλές τοξίνες του και, ιδιαίτερα, στον ρόλο των πρωτεϊνών Cyt (Valtierra-de-Luis, 2020).

### **1.6 Ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα**

Η ανθεκτικότητα είναι ένα φαινόμενο επιλογής, δηλαδή είναι το αποτέλεσμα αλλαγών στις συχνότητες των γονιδίων σε ένα πληθυσμό. Η εφαρμογή της πίεσης επιλογής από την παρουσία του φυτοφαρμάκου έχει ως αποτέλεσμα η συχνότητα των γονοτύπων που δεν επηρεάζονται από την έκθεση σε αυτό να αυξάνει και να αλλάζει η κατανομή του πληθυσμού (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2017).

Η ανθεκτικότητα ενός εντόμου σε ένα εντομοκτόνο ποικίλει από άτομο σε άτομο ενός πληθυσμού. Ο βαθμός αντοχής του κάθε εντόμου σε ένα εντομοκτόνο καθορίζεται από τις ιδιότητες του εντόμου σχετικά με ένα ή περισσότερα στάδια της πορείας του εντομοκτόνου ή των τοξικών παραγωγών του, από τη στιγμή της εφαρμογής του ώσπου να δράσει στο στόχο. Ο διεθνής όρος είναι insecticide resistance υποδηλώνει ότι ένα ευπαθής πληθυσμός γίνεται με την πάροδο των γενεών ανθεκτικός, με επιλογή των ανθεκτικών στο εντομοκτόνο γονιδίων που ο πληθυσμός ήδη έχει. Παράγοντας επιλογής είναι το εντομοκτόνο, που επιλέγει τα ανθεκτικά γονίδια θανατώνοντας τα ευπαθή άτομα (Τζανακάκης, 1995).

Η ταυτόχρονη παραγωγή διαφορετικών τοξινών από το *Bti* πιστεύεται ότι καθυστερεί την εξέλιξη της αντοχής σε πληθυσμούς κουνουπιών. Μελέτες έχουν δείξει ότι το *Bti* μπορεί να παραμένει και να πολλαπλασιάζεται στο περιβάλλον, επιβάλλοντας έτσι συνεχή επιλεκτική πίεση στους πληθυσμούς κουνουπιών, εγείροντας ανησυχίες για τη μακροπρόθεσμη αποτελεσματικότητα αυτού του βιοεντομοκτόνου. Η αντοχή σε κάθε μεμονωμένη τοξίνη του *Bti* μπορεί να επιτευχθεί μετά από μερικές μόνο γενεές επιλογής. Ωστόσο, η αντίσταση στο εμπορικό *Bti* παραμένει χαμηλή (Paris et al., 2011). Επιβάλλοντας μια αυξανόμενη επιλεκτική πίεση στο DFB και *Bti* για εννέα διαδοχικές γενιές στον πληθυσμό του *Ae. albopictus* βρέθηκε

μικρή αύξηση των επιπέδων αντοχής των επιλεγμένων πληθυσμών σε σχέση με τον μάρτυρα - αποικίες που δεν υποβλήθηκαν σε σχετική επιλογή (Ioannou et al., 2021).

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα έντομα ευνοείται από το υψηλό αναπαραγωγικό τους δυναμικό, το σύντομο βιολογικό κύκλο, τις πολλές γενεές ετησίως, ιδιαίτερα σε θερμές συνθήκες περιβάλλοντος. Για την αντιμετώπισή της σημαντικός είναι ο σχεδιασμός κατάλληλων στρατηγικών εφαρμογής των φυτοπροστατευτικών προϊόντων με στόχο τη μείωση της πίεσης επιλογής ανθεκτικών στελεχών, φυλών και βιοτύπων των φυτοπαρασίτων που προϋπάρχουν στο περιβάλλον (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2017).

Μεγάλο μειονέκτημα αποτελεί η αύξηση του κόστους καταπολέμησης, καθώς απαιτούνται συχνότερες εφαρμογές και μεγαλύτερες δόσεις φυτοφαρμάκων για την καταστολή των πληθυσμών. Ακόμα, η έρευνα για την ανάπτυξη νέων εντομοκτόνων είναι πολύ δαπανηρή και χρονοβόρα (Ioannou et al., 2021).

### 1.7 Σκοπός

Πρόσφατα μετά από μια σειρά κοπιωδών πειραμάτων επιλογής ο Ioannou και συνεργάτες (2021) δημιούργησαν πληθυσμούς των *Cx. pipiens pipiens*, *Cx pipiens molestus* και *Ae albopictus* οι οποίοι επιλέχθηκαν για ανθεκτικότητα τόσο στο DFB όσο και στο *Bti* σε μια σειρά γενεών. Απώτερος σκοπός των μελετών το Ioannou et al. (2021) ήταν η μελέτη του πιθανού κόστους που επάγει η πίεση επιλογής από τα εντομοκτόνα. Χρησιμοποιώντας τους πληθυσμούς που αναπτύχθηκαν από τους παραπάνω συγγραφείς στην παρούσα μεταπτυχιακής διατριβής, μελετήθηκε η ανταπόκριση ανθεκτικών και ευπαθών πληθυσμών στις δραστικές ουσίες Diflubenzuron και *Bacillus thuringiensis* subsp. των παραπάνω εντόμων σε θερμικές καταπονήσεις. Επιπλέον μελετήθηκε πως ο εγκλιματισμός σε διαφορετικές θερμοκρασίες επάγει πλαστικότητα και συνεπώς δημιουργεί φαινότυπους με ιδιαίτερη ανταπόκριση στις συνθήκες καταπόνηση.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Συνθήκες διατήρησης των πληθυσμών των κουνουπιών *Aedes albopictus*, *Culex pipiens pipiens* και *Culex pipiens molestus*.

Στο εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας διατηρούνται κουνούπια εργαστηριακής εκτροφής των ειδών: *Ae.s albopictus*, *Cx. pipiens pipiens* και *Cx. pipiens molestus*. Οι πληθυσμοί διατηρούνταν σε ειδικά διαμορφωμένο κλίβανο με θερμοκρασία  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , σχετική υγρασία  $65 \pm 5\%$  και φωτοπερίοδο 14Φ:10Σ με την ένταση του φωτός να προσομοιάζει την αυγή και το σούρουπο. Τα αυγά καθενός πληθυσμού που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία, προέρχονταν έπειτα από τη λήψη γεύματος με αίμα με κατάλληλη διαμορφωμένη συσκευή. Έπειτα τοποθετούνταν μέσα σε πλαστική λεκάνη με 10 lt νερού βρύσης, με τη βοήθεια ενός διηθητικού χαρτιού, στην επιφάνεια του νερού. Οι προνύμφες ταΐζονταν με αλεσμένη γατοτροφή (Friskies adult, Purina) ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Μόλις εμφανίζονταν οι πρώτες νύμφες, μεταφέρονταν με τη βοήθεια μίας πλαστικής πιπέτας (τροποποιημένη έτσι ώστε το άνοιγμά της να είναι μεγαλύτερο από τη νύμφη) σε ένα πλαστικό στρογγυλό και βαθύ δοχείο με νερό βρύσης, χρησιμοποιώντας ένα τουλουπάνι (Εικόνα 9). Έπειτα τοποθετούνταν σε ξύλινα κλουβιά διαστάσεων 30x30x30 cm που είχαν τις τρεις πλευρές καλυμμένες με συρμάτινο πλέγμα (σίτα) και τη μία με γυαλί μαζί με φιαλίδια των 100 mL με φυτίλι και διάλυμα ζάχαρης 10%. Τα κλουβιά που χρησιμοποιούνταν στους πληθυσμούς του *Ae. albopictus* διέθεταν πιο πυκνό πλέγμα για να μην μπορούν να περάσουν μέσα από αυτό τα ενήλικα και να διαφύγουν (Εικόνα 10).

Οι προνύμφες των *Cx. pipiens* εκτέθηκαν για τρεις διαδοχικές γενιές σε σταθερές συγκεντρώσεις DFB και Bti που αντιστοιχούν σε IE80 και LC80, αντίστοιχα. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας επιλογής, έξι έως οκτώ ομάδες  $\approx 1000$  προνυμφών τοποθετήθηκαν σε δοχεία εκτροφής εφοδιασμένα με 3 λίτρα επιτραπέζιου νερού και τη σταθερή δόση κάθε προνυμφοκτόνου. Η επιλογή έναντι του DFB περιλάμβανε προνύμφες τρίτου σταδίου, ενώ 1,2 g τροφής προστέθηκαν στα δοχεία για να επιτραπεί η ανάπτυξη. Η επιλογή κατά του Bti περιλάμβανε την έκθεση προνυμφών πρώιμου τέταρτου σταδίου σε σταθερές δόσεις για 24 ώρες χωρίς πρόσβαση σε τροφή. Για τους πληθυσμούς που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες, δύο επιπλέον ομάδες προνυμφών ( $\approx 1000$  άτομα η καθεμία) μεταχειρίστηκαν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο, αλλά απουσία έκθεσης σε DFB και Bti (γενιά F15). Στο τέλος της διαδικασίας επιλογής (γενιά F12), πραγματοποιήθηκαν νέες βιοδοκιμές για τον καθορισμό των επιπέδων αντίστασης τόσο έναντι του DFB όσο και του Bti. Επιπλέον, αξιολογήθηκε η χειμερινή επιβίωση των απογόνων τόσο του επιλεγμένου πληθυσμού όσο και του πληθυσμού ελέγχου

Οι προνύμφες *Ae. albopictus* επιλέχθηκαν για έξι διαδοχικές γενιές για σταθερές συγκεντρώσεις. Σε αυτό το σημείο, τα επίπεδα ευαισθησίας υπολογίστηκαν εκ νέου και η διαδικασία επιλογής συνεχίστηκε για έξι επιπλέον γενιές με την εφαρμογή των νέων σταθερών δόσεων IE80 και LC80. Για τους πληθυσμούς που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες, δύο επιπλέον ομάδες προνυμφών ( $\approx 1000$  άτομα η καθεμία) μεταχειρίστηκαν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο, αλλά απουσία έκθεσης σε DFB και Bti. Στο τέλος της διαδικασίας επιλογής (γενιά F12), πραγματοποιήθηκαν νέες βιοδοκιμές για τον καθορισμό των επιπέδων αντίστασης τόσο έναντι του DFB όσο και του Bti. Επιπλέον, προσδιορίστηκε η χειμερινή επιβίωση των αυγών διάπαυσης που προέρχονται από κάθε επιλεγμένο πληθυσμό και τον έλεγχο.



Εικόνα 9: Τουλουπάνι και πιπέτα για τη μεταφορά προνυμφών και νυμφών



Εικόνα 10: Ξύλινο κλουβί για *Ae. albopictus* και δεξιά ξύλινο κλουβί για *Cx. pipiens*.

## 2.2. Εφαρμογή του diflubenzuron (DFB) και του *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti).

Για τα πειράματα θερμικής καταπόνησης, χρησιμοποιήθηκαν έντομα εργαστηριακής εκτροφής των μεταχειρίσεων DFB (10.000μl) και Bti (6000μl) της F<sub>12</sub> γενεάς και των τριών πληθυσμών, καθώς και μάρτυρες, δηλαδή χωρίς την εφαρμογή σκευάσματος, της F<sub>15</sub> γενεάς. Η εφαρμογή των σκευασμάτων γινόταν στις προνύμφες. Οι διαδοχικές αραιώσεις γίνονταν αναδεύοντας 20 mL διαλύματος DFB (18 mL ακετόνης +2 mL DFB 0,005%) και 20 mL διαλύματος Bti (18 mL απεσταγμένου νερού + 2 mL Bti 0,1%) αντίστοιχα. Τοποθετούνταν μέσα σε πλαστική λεκάνη με 3 λίτρα επιτραπέζιου νερού και σταθερής δόσης κάθε προνυμφοκτόνου, περίπου 1000 προνύμφες. Για να επιτραπεί η ανάπτυξη νυμφών, οι προνύμφες στις οποίες είχε γίνει εφαρμογή με DFB, ταίζονταν με 1,2 g αλεσμένη γατοτροφή (Friskies adult, Purina). Η επιλογή του Bti περιλάμβανε την έκθεση προνυμφών πρώιμου τετάρτου σταδίου σε σταθερές δόσεις για 24 ώρες χωρίς τροφή. Οι προνύμφες που επέζησαν τοποθετήθηκαν σε μέγιστη πυκνότητα περίπου 1000 ατόμων σε δοχεία εκτροφής με 3 L καθαρού επιτραπέζιου νερού και 1 g τροφής για να ολοκληρωθεί η ανάπτυξη. Οι νύμφες που προέκυψαν από τις διαδικασίες επιλογής DFB και Bti μεταφέρονταν καθημερινά σε κλουβιά και εκτρέφονταν ακολουθώντας το πρωτόκολλο που περιγράφεται στον Ιοαννου (2021).

## 2.3 Πειράματα υπέρψυξης στα ενήλικα

Τα αυγά καθενός πληθυσμού, τοποθετούνταν μέσα σε πλαστική λεκάνη με 10 lt νερού βρύσης, με τη βοήθεια ενός διηθητικού χαρτιού στην επιφάνεια του νερού. Έπειτα επιλέγονταν και μεταφέρονταν 200 προνύμφες 1<sup>ου</sup> σταδίου από κάθε μεταχείριση σε ξεχωριστές λεκάνες με 1,5 lit εμφιαλωμένο νερό και 0,5 ml γατοτροφής. Οι νύμφες τοποθετούνταν σε μικρά πλαστικά και βαθιά δοχεία και μέσα σε τετράγωνα κλουβιά από plexiglas διαστάσεων 20x20x20 cm (Εικόνα 11). Με την εμφάνιση των ενηλίκων, τα κουνούπια διαχωρίζονταν σε κλουβιά plexiglas διαστάσεων 20X20X20 cm<sup>3</sup> ανάλογα με το φύλο και τη μεταχείριση μαζί με φιαλίδια των 100 mL με φυτίλι και διάλυμα ζάχαρης 10%. Στις συνθήκες αυτές παρέμεναν 6-7 μέρες στους ειδικούς διαμορφωμένους κλιβάνους.

Δέκα άτομα από κάθε μεταχείριση και πληθυσμό χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα υπέρψυξης (super cooling point -SCP). Με τη βοήθεια του αναρροφητήρια (Εικόνα 12), τα κουνούπια

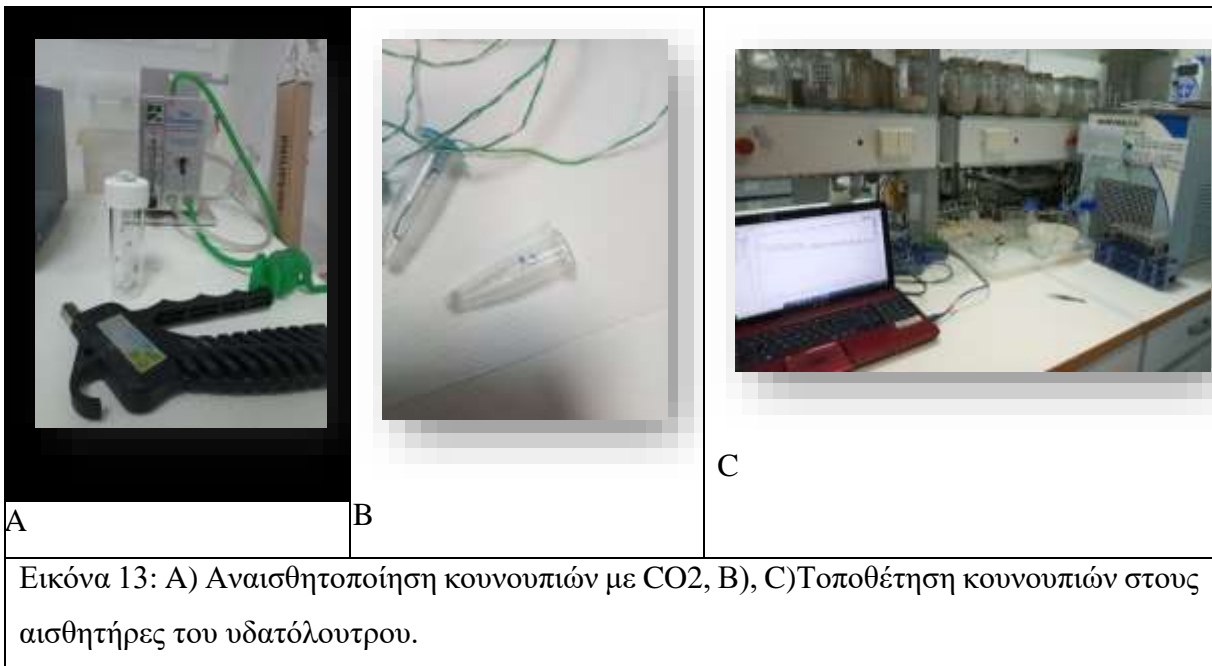


Εικόνα 11: Plexiglas διαστάσεων 20x20x20 cm



Εικόνα 12: Αναρροφητήρας για μεταφορά και μεταχείριση ενήλικων κουνουπιών

μεταφέρονται σε ένα ειδικό φιαλίδιο τύπου falcon, το οποίο διαθέτει μικρό άνοιγμα στο καπάκι που έκλεινε με βαμβάκι. Μέσω αυτού του ανοίγματος, εισέρχεται το CO<sub>2</sub> (Εικόνα 13) προκειμένου να αναισθητοποιήσει τα κουνούπια για να γίνει πιο εύκολα η τοποθέτησή τους στους αισθητήρες της μηχανήματος του υδατόλουτρου. Οι αισθητήρες εμβαπτίζονται πριν μέσα σε βαζελίνη (vaseline with petrolatum). Ο αισθητήρας τοποθετούνταν μεταξύ θώρακα και κοιλιάς των κουνουπιών. Έπειτα ο κάθε ένας αισθητήρας τοποθετείται μέσα σε ένα φιαλίδιο Eppendorf των 2 mL. Το καπάκι του στην περιοχή του αισθητήρα έκλεινε επιπλέον με πλαστελίνη. Όλοι οι αισθητήρες τοποθετούνταν μέσα σε πλαστική σακούλα και αυτή με τη σειρά της μέσα στο υδατόλουτρο (Cole-Parmer, Polystat) το οποίο έχει ρυθμιστεί να κατεβαίνει με σταθερό ρυθμό μέχρι τους -30°C. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την καταγραφή των SCP ήταν το PicoLog.



#### 2.4 Προετοιμασία πειραματικής διαδικασίας

Για τα πειράματα προσδιορισμού των κριτικών σημείων μέγιστων και ελάχιστων θερμοκρασιών (CT<sub>max</sub> –CT<sub>min</sub>), του προσδιορισμού της αντοχής σε συνθήκες έλλειψης υγρασίας και σε συνθήκες έλλειψης τροφής, ακολουθήθηκε η παρακάτω πειραματική διαδικασία.

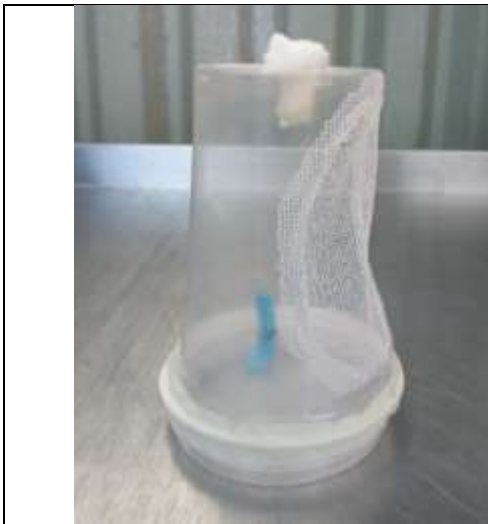
Τα αυγά καθενός πληθυσμού, τοποθετούνταν μέσα σε πλαστική λεκάνη με 10 lt νερού βρύσης, με τη βοήθεια ενός διηθητικού χαρτιού στην επιφάνεια του νερού. Έπειτα επιλέγονταν και μεταφέρονταν 200 προνύμφες 1<sup>ου</sup> σταδίου από κάθε μεταχείριση σε ξεχωριστές λεκάνες με 1,5 lit εμφιαλωμένο νερό και 0,5 ml γατοτροφής.

Οι νύμφες τοποθετούνταν σε μικρά πλαστικά και βαθιά δοχεία και μέσα σε τετράγωνα κλουβιά από plexiglas διαστάσεων 20x20x20 cm.

Με την εμφάνιση των ενηλίκων, 20 άτομα σύνολο από κάθε φύλο και μεταχείριση διαχωρίζονταν σε αυτοσχέδια μικρά κλουβιά από πλαστικό ποτήρι και τούλι στα πλάγια (Εικόνα 14). Το ποτήρι διέθετε τρυβλίο με φυτίλι και διάλυμα ζάχαρης 5%. Παρέμεναν 6 μέρες στους ειδικούς διαμορφωμένους κλιβάνους στους 25° C.

Μετά το πέρας των 6 ημερών, τοποθετούνταν σε διαφορετικούς κλιβάνους με θερμοκρασίες 15, 20, 25 και 30° C για άλλες 6 μέρες με σκοπό των εγκλιματισμό τους (Εικόνα 15).





Εικόνα 14: Αυτοσχέδιο ατομικό κλουβί που χρησιμοποιείται για τη διατήρηση ενηλίκων κουνουπιών. Διακρίνεται ο σπόγγος nitex χρησιμοποιείται για την μεταφορά του ζαχαρόνερου από το υποκείμενο τρυβλίο petri εντός του κλουβιού.

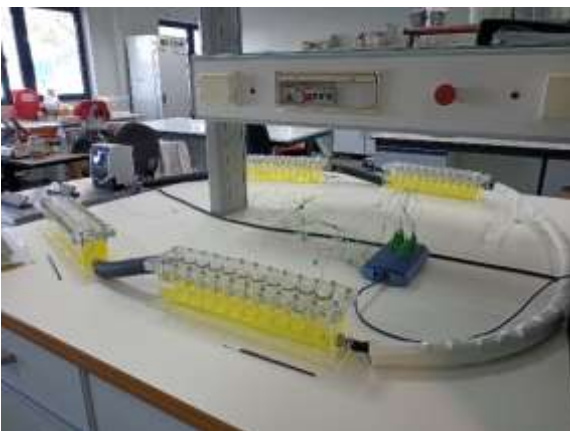


Εικόνα 15: Κλίβανος ελεγχόμενων συνθηκών.

#### 2.4.1 Πειράματα προσδιορισμού των κριτικών σημείων μέγιστων και ελάχιστων θερμοκρασιών (CT<sub>max</sub> –CT<sub>min</sub>)

Για τον προσδιορισμό των κριτικών σημείων μέγιστων και ελάχιστων θερμοκρασιών χρησιμοποιήθηκε κρυόλουτρο (Lauda ECO, Lauda DR.R. Wobser GMBH and Co. KG, Germany) το οποία λειτουργούσε έχοντας ως υγρό μεταφοράς θερμότητας λάδι σιλικόνης. Η θερμοκρασία σε κάθε στατώ ελέγχονταν με αισθητήρες που υπήρχαν τοποθετημένοι ένας σε κάθε στατώ και μέσω του προγράμματος PicoLog καταγράφονταν οι κρίσιμες θερμοκρασίες.

Με τη βοήθεια του αναρροφητήρα, τα κουνούπια μεταφέρονταν σε ειδικά διαμορφωμένα φιαλίδια των στατώ από Plexiglas που έκλειναν από πάνω με βαμβάκι (Εικόνες 16 και 17).



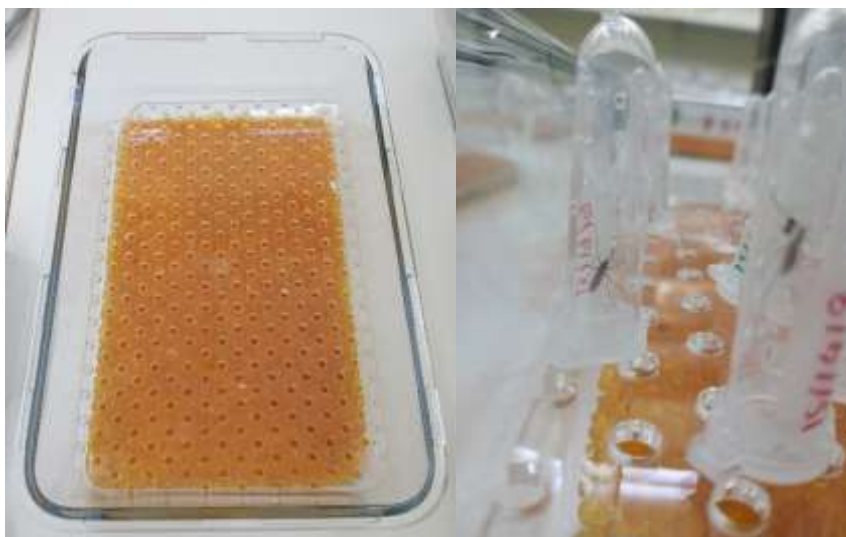
Εικόνα 16: Συσκευή καταγραφής CT<sub>min</sub> και CT<sub>max</sub>.



Εικόνα 17: Στατώ με ενήλικα κουνούπια κατά τη διάρκεια του πειράματος.

#### 2.4.2 Προσδιορισμός αντοχής σε συνθήκες έλλειψης υγρασίας

Η προετοιμασία της πειραματικής διαδικασίας είναι η ίδια όπως στην ενότητα 2.4. Έπειτα τα ενήλικα κουνούπια μεταφέρονταν με τη βοήθεια του αναρροφητήρα σε φιαλίδια Eppendorf των 2 ml, στα οποία είχαν δημιουργηθεί ανοίγματα για τον επαρκή αερισμό των κουνουπιών. Τα φιαλίδια τοποθετούνταν πάνω σε μια πλαστική επιφάνεια μέσα σε γυάλινα δοχεία με 300 gr silica gel και καπάκι ερμητικά κλειστό (Εικόνα 18). Διατηρούνταν σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο με θερμοκρασία  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , σχετική υγρασία  $65 \pm 5\%$  και φωτοπερίοδο 14Φ:10Σ με την ένταση του φωτός να προσομοιάζει την αυγή και το σούρουπο. Κάθε τρεις ώρες καταγράφονταν η κατάσταση των κουνουπιών. Με ζυγαριά ακριβείας (Precisa 40Sm-200A) (Εικόνα 19), καταγράφονταν το βάρος των φιαλιδίων, το βάρος των κουνουπιών μαζί με το φιαλίδιο και μετά την διεξαγωγή του πειράματος και τον θάνατο των κουνουπιών, καταγράφονταν και το τελικό βάρος των κουνουπιών.



Εικόνα 18: Γυάλινο δοχείο με silica gel και φιαλίδια με ενήλικα κουνούπια



Εικόνα 19: Ζυγαριά ακριβείας για την καταγραφή του βάρους των ενήλικων κουνουπιών.

#### 2.4.3 Προσδιορισμός αντοχής σε συνθήκες έλλειψης τροφής

Η προετοιμασία της πειραματικής διαδικασίας είναι η ίδια όπως στην ενότητα 2.4. Έπειτα τα ενήλικα κουνούπια μεταφέρονταν με τη βοήθεια του αναρροφητήρα σε φιαλίδια Eppendorf των 2 ml, στα οποία είχαν δημιουργηθεί ανοίγματα για τον επαρκή αερισμό των κουνουπιών. Τα φιαλίδια τοποθετούνταν σε μια πλαστική επιφάνεια και αυτή με τη σειρά της μέσα σε γυάλινα δοχεία με νερό και με καπάκι ερμητικά κλειστό (Εικόνα 20). Διατηρούνταν σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο με θερμοκρασία  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , σχετική υγρασία  $65 \pm 5\%$  και φωτοπερίοδο 14Φ:10Σ με την ένταση του φωτός να προσομοιάζει την αυγή και το σούρουπο. Κάθε τρεις ώρες ελέγχονταν η επιβίωση των ενήλικων κουνουπιών.



Εικόνα 20: Γυάλινο δοχείο με ενήλικα κουνούπια σε φιαλίδια Eppendorf των 2 ml tubes για τον προσδιορισμό της αντοχής σε συνθήκες έλλειψης τροφής.

## 2.5 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό jamovi. Προσδιορίστηκαν με ανάλυση συνδιακύμανσης με τη θερμοκρασία εγκλιματισμού ως προς τον παράγοντα που συμπαράλλάσει οι επιδράσεις των τριών ειδών κουνουπιών *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. pipiens molestus* και *Ae. albopictus*.

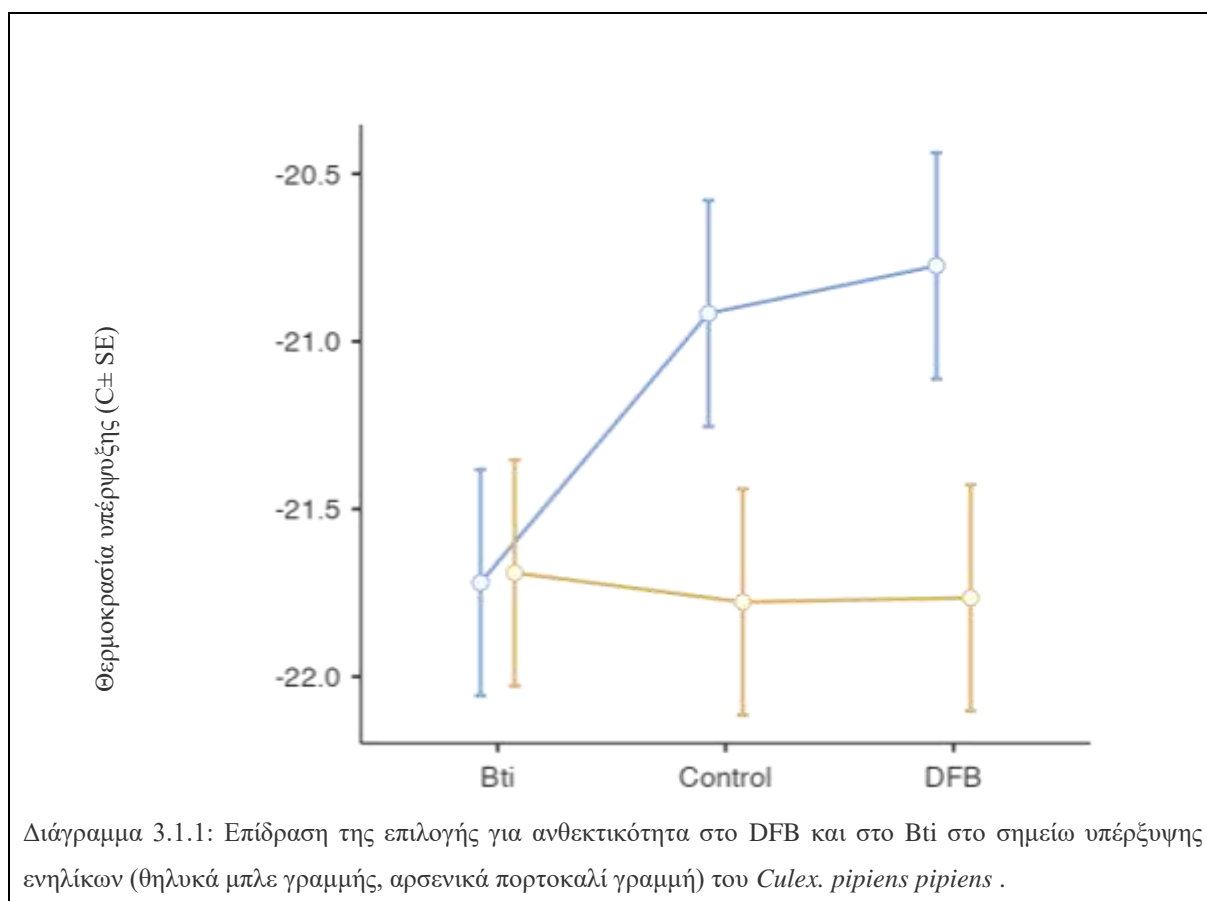
Επίσης έγινε ανάλυση με γενικευμένα γραμμικά μοντέλα για την επίδραση του είδους, του φύλου και της μεταχείρισης στο CTmax και CTmin. Στο SCP πραγματοποιήθηκε ανάλυση παραλλακτικότητας επαναλαμβανόμενων μετρήσεων.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Σημείο υπέρψυξης (Super cooling point) στα ενήλικα

##### 3.1.1 *Culex pipiens pipiens*

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3.1.1 οι τιμές του σημείου υπέρψυξης κυμάνθηκαν μεταξύ -20,5 και -22.0 °C. Το σημείο υπέρψυξης δεν επηρεάστηκε από την επιλογή για ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα ( $P > 0.05$ ; Πίνακας 3.1.1). Αντίθετα το σημείο υπέρψυξης ήταν υψηλότερο στα θηλυκά σε σχέση με τα αρσενικά ( $P = 0.02$ ). Οι διαφορές μεταξύ των δύο φύλων ήταν μεγαλύτερη στο μάρτυρα και στον πληθυσμό που είχε υποστεί επιλογή για ανθεκτικότητα στο DFB (Διάγραμμα 3.1.1) σε σχέση με τον πληθυσμό που επιλέχθηκε για ανθεκτικότητα στο Bti αν και δε σημειώθηκε σημαντική αλληλεπίδρασης μεταξύ (Πίνακα 3.1.1).

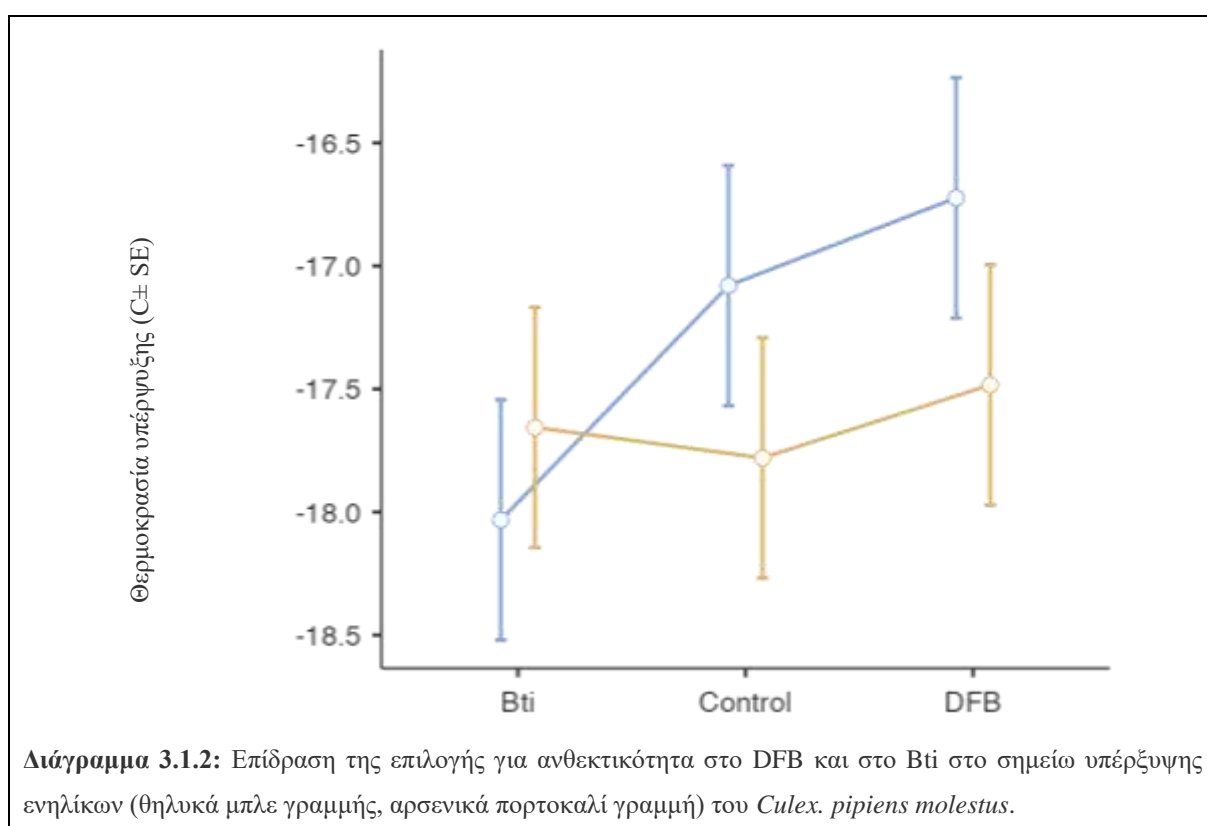


**Πίνακας 3.1.1** Ανάλυση παραλλακτικότητας για την επίδραση της επιλογής για ανθεκτικότητα στο DFB και στο Bti και του φύλου στο σημείο υπέρψυξης ενηλίκων του *Culex. pipiens pipiens*.

Πηγή παραλλακτικότητας	Άθροισμα τετραγώνων	df	F	P
Μεταχείριση	4.31	2	0.948	0.391
Φύλο	11.07	1	4.864	0.029
Μεταχείριση X φύλο	6.16	2	1.353	0.262
Σφάλμα	259.47	114		

### 3.1.2 *Culex pipiens molestus*

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι ούτε η επίδραση της επιλογής για ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα, ούτε το φύλο και ούτε η αλληλεπίδραση τους είχαν σημαντική επίδραση στο σημείο υπέρψυξης των ενηλίκων του *Cx. pipiens molestus* (Πίνακας 3.1.2; Διάγραμμα 3.1.2). Οι μέσες τιμές του σημείου υπέρψυξης των θηλυκών και αρσενικών ήταν παραπλήσιες και κυμάνθηκαν από περίπου -16,5 έως -18,0 °C.

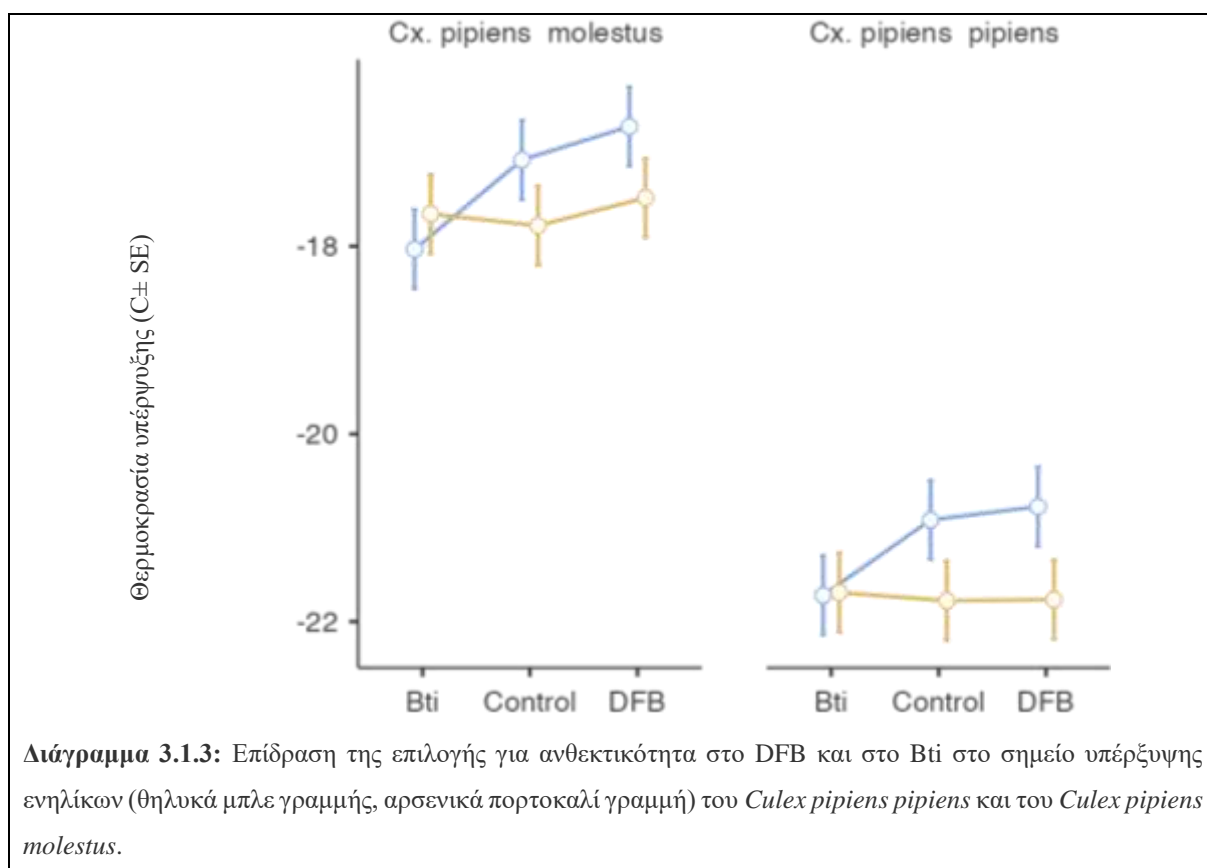


**Πίνακας 3.1.2** Ανάλυση παραλλακτικότητας για την επίδραση της επιλογής για ανθεκτικότητα στο DFB και στο Bti και του φύλου στο σημείο υπέρψυξης ενηλίκων του *Culex pipiens molestus*.

Πηγή παραλλακτικότητας	Άθροισμα τετραγώνων	df	F	P
Μεταχείριση	11.02	2	1.155	0.319
Φύλο	3.92	1	0.821	0.367
Μεταχείριση X φύλο	8.17	2	0.857	0.427
Σφάλμα	543.65	114		

### 3.1.3 Σύγκριση του σημείου υπέρψυξης μεταξύ των δύο βιοτόπων του *Culex pipiens*

Στο Διάγραμμα 3.1.3 δίνονται συγκριτικά τα σημεία υπέρψυξης των ενηλίκων των δύο βιοτόπων του *Cx. pipiens* και καταδεικνύεται η μεγάλη διαφορά μεταξύ τους. Ανεξάρτητα από την επιλογή για ανθεκτικότητα στα δύο εντομοκτόνα τα ενήλικα του βιοτόπου *molestus* εκδήλωσαν υψηλότερο SCP σε σχέση με εκείνα της μορφής *pipiens*. Η διαφορά ήταν ιδιαίτερα μεγάλη και έφτανε σχεδόν στους 4 °C. Η ανάλυση παραλλακτικότητας των αποτελεσμάτων έδειξε ότι το φύλο και υποείδος ήταν σημαντικοί εκτιμητές του SCP των ενηλίκων ενώ η επιλογή για ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα όχι (Πίνακας 3.1.3). Καμιά από τις αλληλεπιδράσεις δεν ήταν σημαντική.

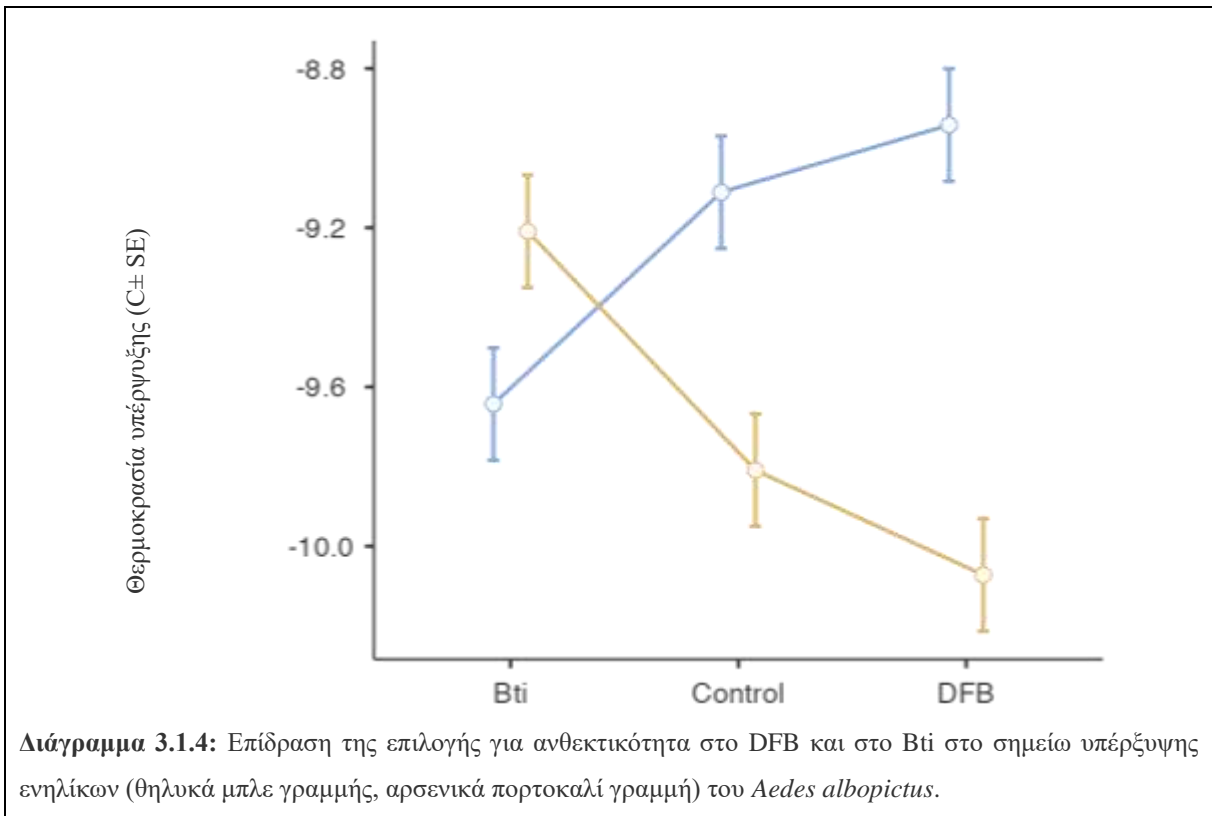


**Πίνακας 3.1.3** Ανάλυση παραλλακτικότητας για την επίδραση της επιλογής για ανθεκτικότητα στο DFB και στο Βτί, του φύλου και του βιοτύπου στο σημείο υπέρψυξης ενηλίκων του *Culex pipiens*.

Πηγή παραλλακτικότητας	Άθροισμα τετραγώνων	df	F	P
Φύλο	14.2759	2	2.0264	0.134
Μεταχείριση	14.0796	1	3.9971	0.047
Βιότυπος	951.1007	1	270.01	< .001
Μεταχείριση X φύλο	14.2454	2	2.02	0.135
Μεταχείριση X είδος	1.0563	2	0.14	0.861
Φύλο X είδος	0.9090	1	0.25	0.612
Μεταχείριση X είδος X φύλο	0.0883	2	0.01	0.988
Σφάλμα	803.1209	228		

#### 3.1.4 *Aedes albopictus*

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η επίδραση της επιλογής για ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα δεν ήταν σημαντικός εκτιμητής του SCP των ενηλίκων του *Ae. albopictus* σε αντίθεση με το φύλο και την αλληλεπίδραση φύλο X “επιλογής για ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα” (Πίνακας 3.1.4; Διάγραμμα 3.1.4). Οι μέσες τιμές του σημείου υπέρψυξης των θηλυκών και αρσενικών διέφεραν ιδιαίτερα στον μάρτυρα και στον πληθυσμό που είχε επιλεγεί για ανθεκτικότητα στο DFB. Αξίζει να σημειωθεί ότι το σημείο υπέρψυξης ήταν περίπου -9 και -10 °C για τα θηλυκά και τα αρσενικά που επιλέχθηκαν για ανθεκτικότητα στο DFB (Διάγραμμα 3.1.4).



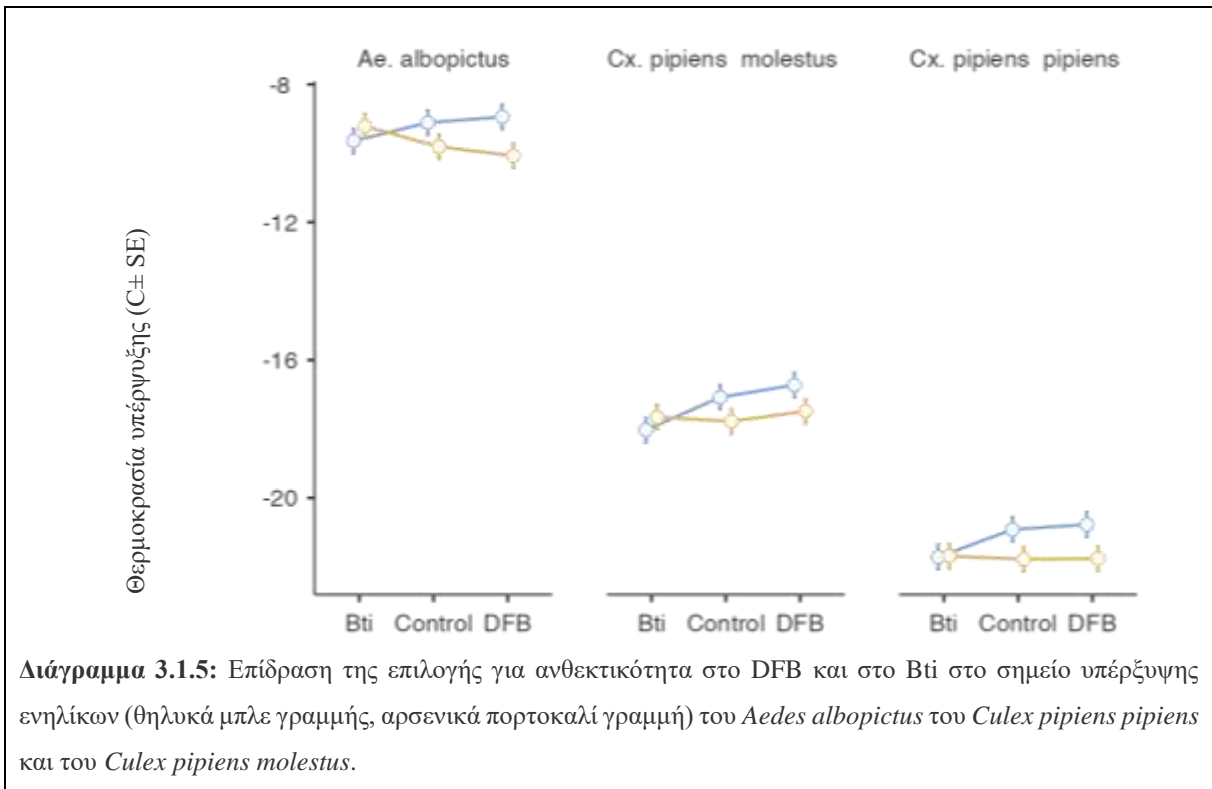
**Πίνακας 3.1.4** Ανάλυση παραλλακτικότητας για την επίδραση της επιλογής για ανθεκτικότητα στο DFB και στο Bti και του φύλου στο σημείο υπέρψυξης ενηλίκων του *Aedes albopictus*.

Πηγή παραλλακτικότητας	Άθροισμα τετραγώνων	df	F	P
Μεταχείριση	0.132	2	0.166	0.847
Φύλο	6.477	1	16.230	< .001
Μεταχείριση X φύλο	13.047	2	16.345	< .001
Σφάλμα	45.499	114		

### 3.1.5 Σύγκριση του σημείου υπέρψυξης μεταξύ των δύο βιοτύπων του *Culex pipiens* και του *Aedes albopictus*

Στο Διάγραμμα 3.1.5 δίνεται συγκριτικά το σημείο υπέρψυξης των ενηλίκων των δύο βιοτύπων του *Cx. pipiens* και του *Ae. albopictus* και καταδεικνύεται η μεγάλη διαφορά μεταξύ τους. Ανεξάρτητα από την επιλογή για ανθεκτικότητα στα δύο εντομοκτόνα τα ενήλικα του *Ae. albopictus* εκδήλωσαν πολύ υψηλότερο SCP σε σχέση με εκείνα των δύο βιοτύπων του *Cx. pipiens* που όπως αναφέρθηκε και παραπάνω διέφεραν μεταξύ τους. Η διαφορά μεταξύ του *Ae. albopictus* και του *Cx. pipiens pipiens* ήταν μεγάλη από 10°C.



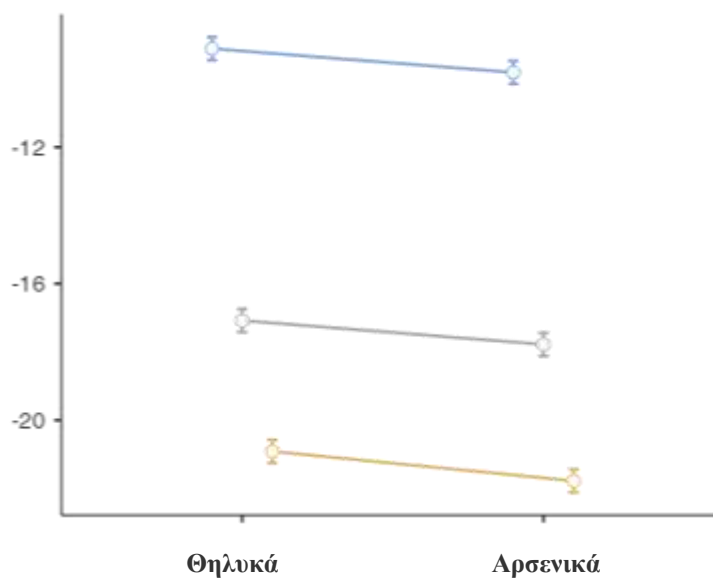


Η ανάλυση παραλακτικότητας στην οποία υποβλήθηκαν τα στοιχεία που αφορούσαν τους πληθυσμούς των τριών ειδών που δεν υπέστησαν επιλογή για ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα επιβεβαίωσαν την διαφορά στο SCP και επίσης τη διαφορά μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ανεξάρτητα από το είδος του κουνουπιού (Πίνακας 3.1.5). Η αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων δεν ήταν σημαντική (Διάγραμμα 3.1.6).

**Πίνακας 3.1.5** Ανάλυση παραλλακτικότητας για την επίδραση της επιλογής για ανθεκτικότητα στο DFB και στο Bti, του φύλου και του βιοτύπου στο σημείο υπέρψυξης ενηλίκων του *Aedes albopictus* και των δύο βιοτύπων του *Culex ripiens*.

Πηγή παραλλακτικότητας	Άθροισμα τετραγώνων	df	F	P
Είδος	2935.52	2	637.4876	< .001
Φύλο	17.01	1	7.3880	0.008
Είδος X φύλο	0.17	2	0.0380	0.963
Σφάλμα	262.47	114		

Θερμοκρασία υπέρψυξης ( $C \pm SE$ )

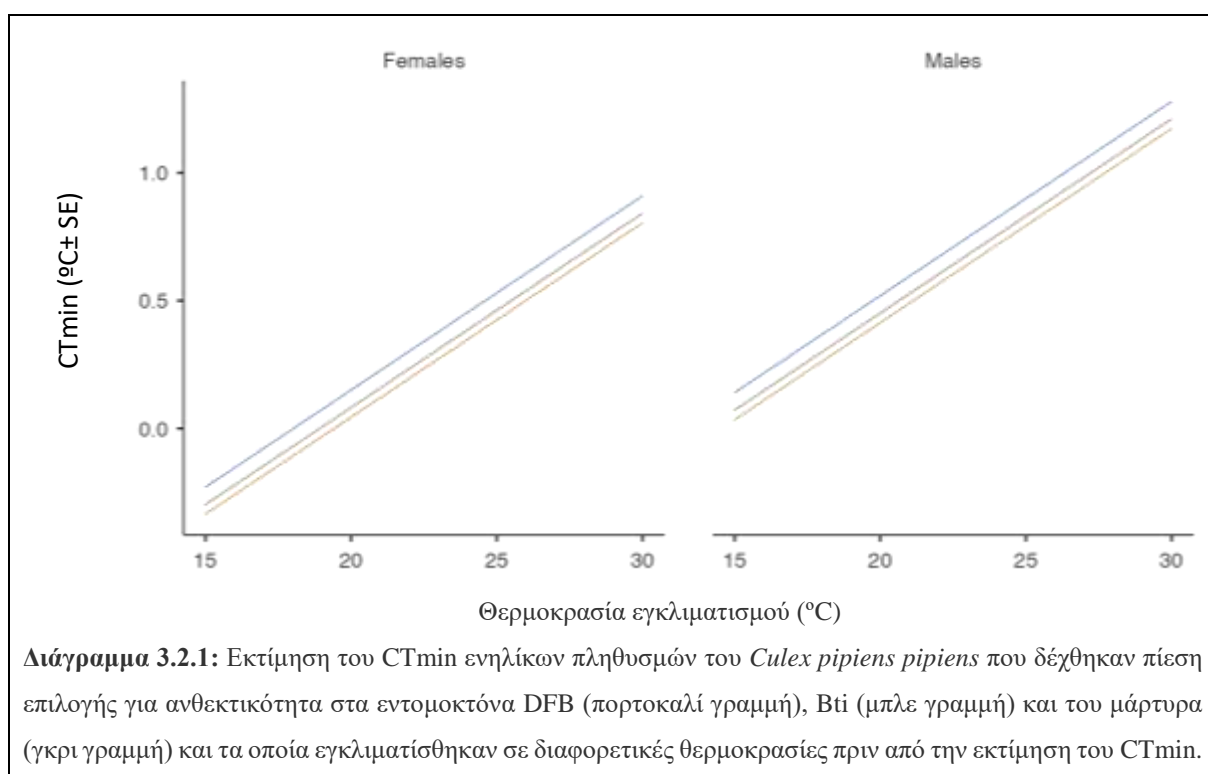


**Διάγραμμα 3.1.6:** Το σημείο υπέρψυξης ενηλίκων ενηλίκων του *Aedes albopictus* (μπλε γραμμή) του *Culex ripiens molestus* (γκρι γραμμή) και του *Culex ripiens ripiens* (πορτοκαλί γραμμή).

## 3.2 Αποτελέσματα πειραμάτων προσδιορισμού των κριτικών σημείων ελάχιστων θερμοκρασιών (CTmin)

### 3.2.1 *Culex ripiens ripiens*

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3.2.1 οι τιμές του CTmin επηρεάστηκαν από τη θερμοκρασία εγκλιματισμού και το φύλο, και από την επιλογή για ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα DFB και Bti. Το CTmin των ατόμων που είχαν εγκλιματιστεί στους 15 °C ήταν περίπου 1,5 °C χαμηλότερο από εκείνο των ατόμων που είχαν εγκλιματιστεί στους 30 °C. Οι τιμές του CTmin ήταν ελαφρώς υψηλότερες στον πληθυσμό που είχε δεχθεί επιλογή για ανθεκτικότητα στο Bti. Στον Πίνακα 3.2.2 δίνονται αναλυτικά οι μέσες τιμές του CTmin για όλες τις μεταχειρίσεις.



**Πίνακας 3.2.1** Μέσος όρος  $\pm$  SE CT<sub>min</sub> πληθυσμών του *Aedes albopictus*, *Culex pipiens molestus* και *Culex pipiens pipiens* οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε επιλογή για ανθεκτικότητα στο DFB και στο *Bti* και εγκλιματίστηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες πριν από τις πειραματικές μετρήσεις

Θερμοκρασία εγκλιματισμού (°C)	CT <sub>min</sub> $\pm$ SE							
	Θηλυκά				Males			
	15	20	25	30	15	20	25	30
<b>Μεταχείριση</b>								
	<i>Aedes albopictus</i>							
<i>Bti</i>	3.53 $\pm$ 0.88	3.55 $\pm$ 0.75	4.34 $\pm$ 0.89	5.17 $\pm$ 1.07	4.25 $\pm$ 1.05	4.56 $\pm$ 1.35	4.58 $\pm$ 0.51	4.97 $\pm$ 1.18
Μάρτυρας	3.81 $\pm$ 0.79	3.80 $\pm$ 0.89	4.42 $\pm$ 1.19	5.17 $\pm$ 1.02	3.91 $\pm$ 0.65	4.12 $\pm$ 0.91	4.61 $\pm$ 1.08	5.19 $\pm$ 0.49
DFB	3.88 $\pm$ 0.65	3.77 $\pm$ 0.56	4.44 $\pm$ 0.77	4.51 $\pm$ 0.70	4.00 $\pm$ 0.97	4.14 $\pm$ 0.56	4.46 $\pm$ 0.68	5.12 $\pm$ 0.78
	<i>Cx. pipiens molestus</i>							
<i>Bti</i>	0.00 $\pm$ 0.59	1.03 $\pm$ 0.49	1.24 $\pm$ 0.88	1.98 $\pm$ 1.12	-0.06 $\pm$ 0.47	1.01 $\pm$ 0.56	0.68 $\pm$ 0.69	2.27 $\pm$ 0.73
Μάρτυρας	0.02 $\pm$ 0.42	0.78 $\pm$ 0.74	0.79 $\pm$ 0.98	1.75 $\pm$ 0.39	0.86 $\pm$ 0.83	0.40 $\pm$ 0.52	1.61 $\pm$ 0.57	2.62 $\pm$ 0.98
DFB	0.30 $\pm$ 0.38	0.78 $\pm$ 1.08	0.91 $\pm$ 0.42	1.26 $\pm$ 0.77	0.45 $\pm$ 0.68	0.81 $\pm$ 1.16	1.91 $\pm$ 0.87	2.25 $\pm$ 0.72
	<i>Cx. pipiens pipiens</i>							
<i>Bti</i>	-0.17 $\pm$ 0.35	0.42 $\pm$ 0.32	0.52 $\pm$ 0.59	1.20 $\pm$ 0.56	-0.13 $\pm$ 0.74	0.41 $\pm$ 0.45	0.60 $\pm$ 0.58	1.36 $\pm$ 0.48
Μάρτυρας	-0.79 $\pm$ 0.46	0.04 $\pm$ 0.50	0.35 $\pm$ 0.51	0.99 $\pm$ 0.56	0.25 $\pm$ 0.72	0.25 $\pm$ 0.37	0.93 $\pm$ 0.39	1.65 $\pm$ 0.82
DFB	-0.06 $\pm$ 0.89	0.32 $\pm$ 0.74	0.06 $\pm$ 0.61	0.53 $\pm$ 0.61	0.59 $\pm$ 1.32	0.25 $\pm$ 1.28	0.56 $\pm$ 0.64	1.11 $\pm$ 0.49

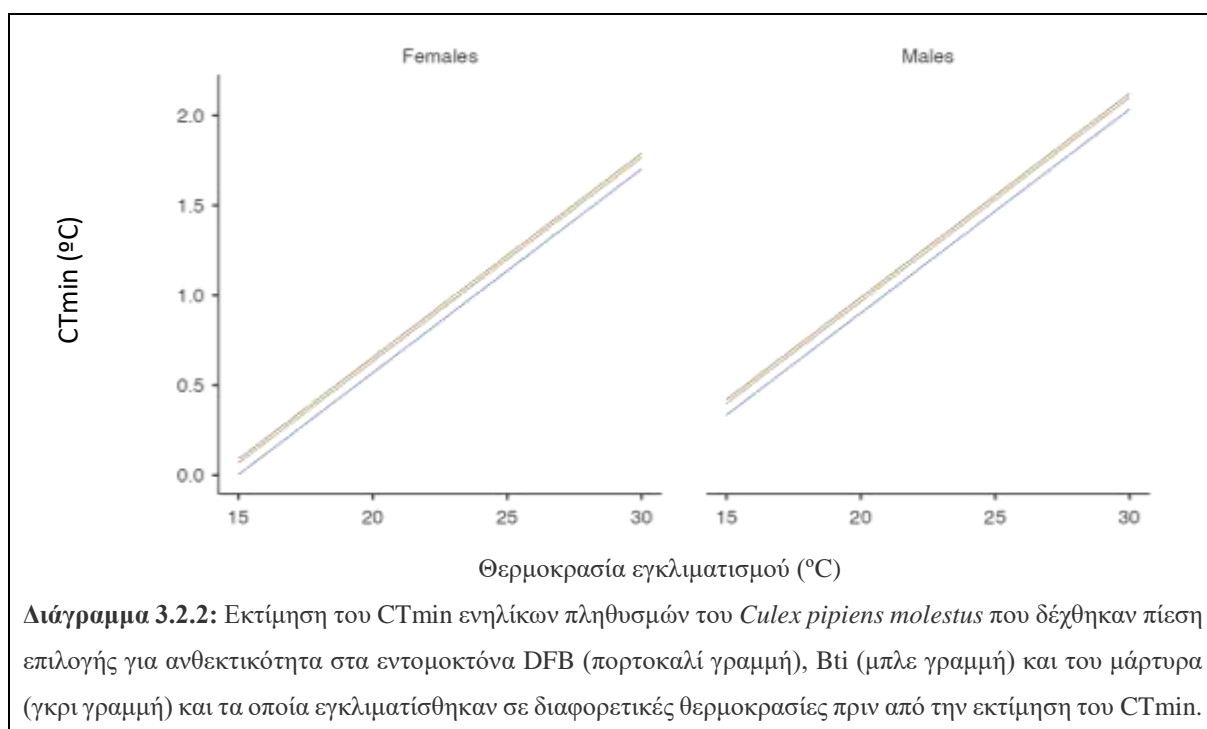
Η ανάλυση συμπαράταξης έδειξε ότι η θερμοκρασία εγκλιματισμού, η μεταχείριση και το φύλο ήταν σημαντικοί εκτιμητές του CT<sub>min</sub> των ενηλίκων όπως και οι αλληλεπιδράσεις μεταχείριση με το φύλο και θερμοκρασία εγκλιματισμού με τη μεταχείριση (Πίνακας 3.2.2).

**Πίνακας 3.2.2** Ανάλυση συνδιακύμανσης για την επίδραση της επιλογής για ανθεκτικότητα στο DFB και στο Bti και του φύλου στο σημείο χαμηλής θερμοκρασίας (CTmin) ενηλίκων του *Culex ripiens ripiens*.

Πηγή παραλλακτικότητας	Άθροισμα τετραγώνων	df	F	P
Θερμοκρασία εγκλιματισμού	43.30	1	96.21	< .001
Μεταχείριση	6.11	2	6.79	0.001
Φύλο	8.17	1	18.15	< .001
Μεταχείριση X Φύλο	3.16	2	3.51	0.032
Θερμοκρασία εγκλιματισμού X Μεταχείριση	7.01	2	7.79	< .001
Σφάλμα	103.96	231		

### 3.2.2 *Culex ripiens molestus*

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3.2.2 οι τιμές του CTmin επηρεάστηκαν από τη θερμοκρασία εγκλιματισμού όχι όμως από την επιλογή για ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα DFB και Bti. Επίσης, οι τιμές των αρσενικών και των θηλυκών ενηλίκων ήταν παραπλήσια. Το CTmin των ατόμων που είχαν εγκλιματιστεί στους 15 °C ήταν περίπου 1,5 °C χαμηλότερο από εκείνο των ατόμων που είχαν εγκλιματιστεί στους 30 °C. Στον Πίνακα 3.2.3 δίνονται οι μέση τιμές του CTmin.



**Διάγραμμα 3.2.2:** Εκτίμηση του CTmin ενηλίκων πληθυσμών του *Culex ripiens molestus* που δέχθηκαν πίεση επιλογής για ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα DFB (πορτοκαλί γραμμή), Bti (μπλε γραμμή) και του μάρτυρα (γκρι γραμμή) και τα οποία εγκλιματίστηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες πριν από την εκτίμηση του CTmin.

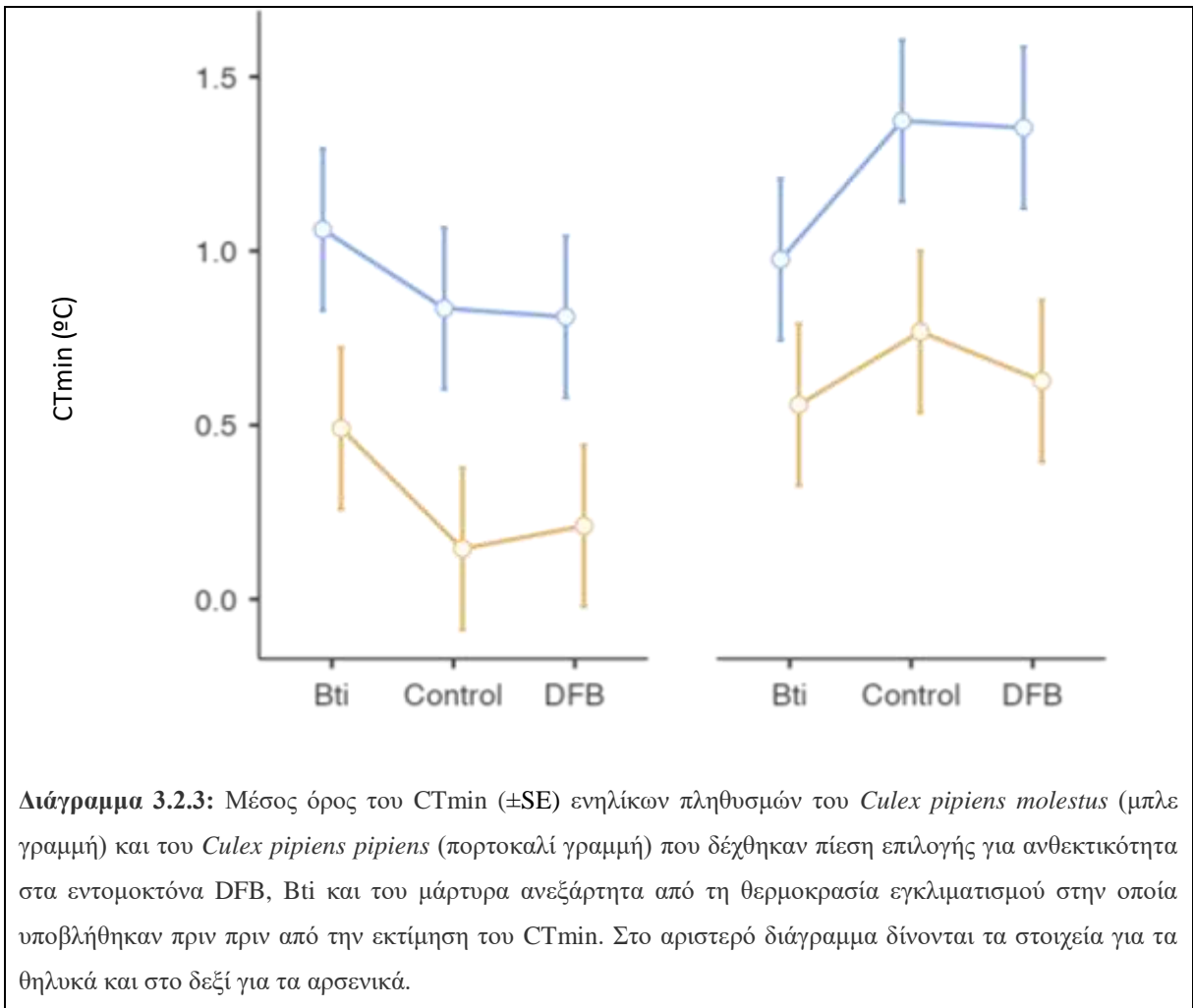
Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι μόνο η θερμοκρασία εγκλιματισμού ήταν εκτιμητής του CT<sub>min</sub> των ενηλίκων για το βιότυπο *Cx. pipiens molestus* (Πίνακας 3.3.2).

**Πίνακας 3.2.3** Ανάλυση συνδιακύμανσης για την επίδραση της επιλογής για ανθεκτικότητα στο DFB και στο Bti και του φύλου στο σημείο χημηλή θερμοκρασίας (CT<sub>min</sub>) ενηλίκων του *Culex. pipiens molestus*.

Πηγή παραλλακτικότητας	Άθροισμα τετραγώνων	df	F	P
Θερμοκρασία εγκλιματισμού	96.311	1	159.42	< .001
Μεταχείριση	1.531	2	1.27	0.284
Φύλο	0.745	1	1.23	0.268
Μεταχείριση X Φύλο	5.238	2	4.34	0.014
Θερμοκρασία εγκλιματισμού X Φύλο	2.336	1	3.87	0.050
Θερμοκρασία εγκλιματισμού X Μεταχείριση	1.411	2	1.17	0.313
Σφάλμα	138.947	230		

### 3.2.3 Σύγκριση του σημείου CT<sub>min</sub> μεταξύ των δύο βιοτύπων του *Culex pipiens*

Στο Διάγραμμα 3.1.3 δίνονται συγκριτικά οι τιμές CT<sub>min</sub> των ενηλίκων των δύο βιοτύπων του *Cx. pipiens* ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία εγκλιματισμού και καταδεικνύεται η διαφορά μεταξύ τους. Ο βιότυπος *Cx. pipiens molestus* εκδήλωσε υψηλότερες τιμές CT<sub>min</sub> σε σχέση με τον βιότυπο *Cx. pipiens pipiens* ανεξάρτητα από την επιλογή για ανθεκτικότητα στα δύο εντομοκτόνα και το φύλο. Η τιμές του CT<sub>min</sub> ήταν υψηλότερες στα αρσενικά από ότι στα θηλυκά. Η επιλογή για ανθεκτικότητα στο Bti φαίνεται ότι αυξάνει το CT<sub>min</sub> των θηλυκών, ενώ μειώνει εκείνο των αρσενικών ιδιαίτερα στο βιότυπο *Cx. pipiens molestus*.



Η ανάλυση παραλακτικότητας των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η θερμοκρασία εγκλιματισμού, το φύλο και υποείδος ήταν σημαντικοί εκτιμητές του CTmin των ενηλίκων όπως επίσης και η επιλογή για ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα (Πίνακας 3.2.4). Καμία από τις αλληλεπιδράσεις δεν ήταν σημαντική.

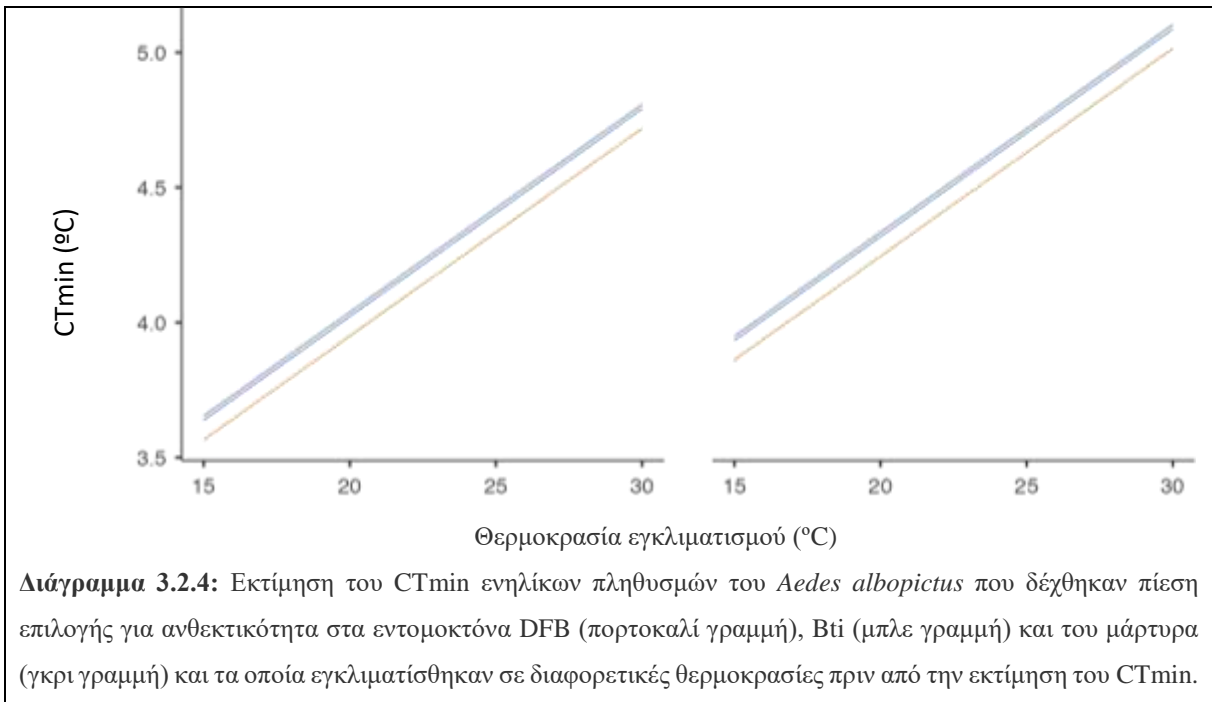
**Πίνακας 3.2.4** Ανάλυση συνδιακύμανσης για την επίδραση της θερμοκρασίας εγκλιματισμού. της επιλογής για ανθεκτικότητα στο DFB και στο Βτί, του φύλου και του βιοτύπου στο CTmin ενηλίκων του *Culex. pipiens*.

Πηγή παραλλακτικότητας	Άθροισμα τετραγώνων	df	F	P
Θερμοκρασία εγκλιματισμού	134.3793	12	30.3319	< .001
Είδος	43.4524	1	242.3999	< .001
Φύλο	14.7350	1	78.3815	< .001
Μεταχείριση	0.0752	1	26.5797	< .001
Είδος * Φύλο	0.0414	2	0.0679	0.934
Είδος * Μεταχείριση	0.7048	1	0.0748	0.785
Φύλο * Μεταχείριση	7.9666	2	0.6357	0.530
Είδος * Φύλο * Μεταχείριση	0.4267	2	7.1853	< .001
Residuals	258.8910	2	0.3848	0.681
		467		

### 3.2.4 *Aedes albopictus*

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3.2.4 οι τιμές του CTmin επηρεάστηκαν από τη θερμοκρασία εγκλιματισμού όχι όμως από την επιλογή για ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα DFB και Βτί. Επίσης, οι τιμές των αρσενικών και των θηλυκών ενηλίκων ήταν παραπλήσια. Το CTmin των ατόμων που είχαν εγκλιματιστεί στους 15 °C ήταν περίπου 1,5 °C χαμηλότερο από εκείνο των ατόμων που είχαν εγκλιματιστεί στους 30 °C. Στον Πίνακα 3.2.1 δίνονται οι μέση τιμές του CTmin.





Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι μόνο η θερμοκρασία εγκλιματισμού και το φύλο ήταν οι δύο σημαντικοί εκτιμητές του CT<sub>min</sub> των ενηλίκων του *Ae. albopictus* (Πίνακας 3.3.5).

**Πίνακας 3.2.5** Ανάλυση συνδιακύμανσης για την επίδραση της επιλογής για ανθεκτικότητα στο DFB και στο Bti και του φύλου στο CT<sub>min</sub> ενηλίκων του *Aedes albopictus*.

Πηγή παραλλακτικότητας	Άθροισμα τετραγώνων	df	F	P
Θερμοκρασία εγκλιματισμού	44.314	1	58.911	< .001
Μεταχείριση	0.357	2	0.238	0.789
Φύλο	5.233	1	6.957	0.009
Μεταχείριση * Φύλο	0.879	2	0.584	0.558
Residuals	175.267	233		< .001

3.2.5 Σύγκριση του CT<sub>min</sub> μεταξύ των δύο βιοτόπων του *Culex pipiens* και του *Aedes albopictus*

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η θερμοκρασία εγκλιματισμού, το είδος κουνουπιού και το φύλο ήταν σημαντικοί εκτιμητές του CT<sub>min</sub>. Όλες οι αλληλεπιδράσεις δεν ήταν σημαντικές (Πίνακας 3.2.6). Το CT<sub>min</sub> ήταν υψηλότερο στο *Ae. albopictus* ακολουθούμενο από το *Cx. pipiens molestus* και τέλος από το *Cx. pipiens pipiens*.

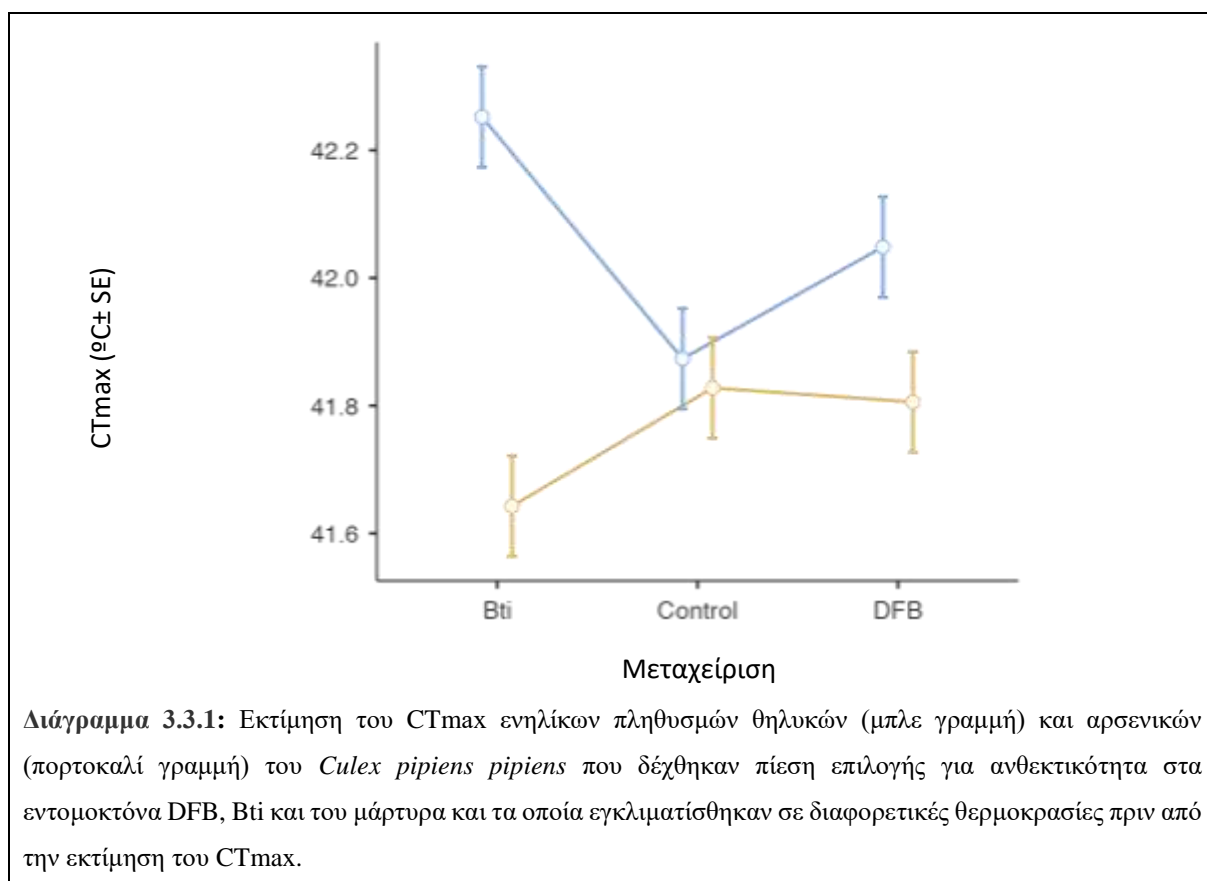
**Πίνακας 3.2.6** Αποτελέσματα γενικευμένου γραμμικού μοντέλου για την επίδραση του είδους, του φύλου, της θερμοκρασίας εγκλιματισμού και της επιλογής για ανθεκτικότητα στο DFB και στο *Bti* στο CTmin ενηλίκων του *Aedes albopictus* και των δύο βιοτύπων του *Culex pipiens*.

<b>Πηγή παραλλακτικότητας</b>	<b>X<sup>2</sup></b>	<b>df</b>	<b>P</b>
Θερμοκρασία εγκλιματισμού	284.931	1	< .001
Είδος	3361.732	2	< .001
Μεταχείριση	0.519	2	0.771
Φύλο	31.929	1	< .001
Είδος * Μεταχείριση	1.311	4	0.859
Είδος * Φύλο	0.262	2	0.877
Μεταχείριση * Φύλο	5.134	2	0.077
Είδος * Μεταχείριση * Φύλο	9.782	4	0.044

### 3.3 Αποτελέσματα πειραμάτων προσδιορισμού των κριτικών σημείων μέγιστων θερμοκρασιών (CTmax)

#### 3.3.1 *Culex pipiens pipiens*

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3.3.1 οι τιμές του CTmax επηρεάστηκαν από τη θερμοκρασία εγκλιματισμού και το φύλο, και από την επιλογή για ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα DFB και Bti. Το CTmax των ατόμων που είχαν εγκλιματιστεί στους 15 °C ήταν περίπου 1 °C χαμηλότερο από εκείνο των ατόμων που είχαν εγκλιματιστεί στους 30 °C. Οι τιμές του CTmax ήταν ελαφρώς υψηλότερες στον πληθυσμό που είχε δεχθεί επιλογή για ανθεκτικότητα στο DFB καθώς και στο μάρτυρα. Στον Πίνακα 3.3.1 δίνονται αναλυτικά οι μέσες τιμές του CTmax για όλες τις μεταχειρίσεις.



**Πίνακας 3.3.1:** Μέσος όρος  $\pm$  SE CT<sub>min</sub> πληθυσμών του *Aedes albopictus*, *Culex pipiens molestus* και *Culex pipiens pipiens* οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε επιλογή για ανθεκτικότητα στο DFB και στο *Bti* και εγκλιματίστηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες πριν από τις πειραματικές μετρήσεις.

Θερμοκρασία εγκλιματισμού	CT <sub>max</sub> (°C; Μέσος όρος $\pm$ SD)							
	Females				Males			
	15	20	25	30	15	20	25	30
<i>Ae. albopictus</i>								
<i>Bti</i>	45.3 $\pm$ 0.8	45.9 $\pm$ 0.3	45.6 $\pm$ 0.5	45.1 $\pm$ 0.8	44.7 $\pm$ 0.8	45.2 $\pm$ 0.5	45.1 $\pm$ 0.5	45.2 $\pm$ 0.6
Control	45.1 $\pm$ 0.8	45.5 $\pm$ 0.7	45.1 $\pm$ 0.5	45.9 $\pm$ 0.3	44.9 $\pm$ 0.3	44.7 $\pm$ 0.4	45.3 $\pm$ 0.5	45.5 $\pm$ 0.3
DFB	45.3 $\pm$ 0.6	45.3 $\pm$ 0.6	45.7 $\pm$ 0.6	45.1 $\pm$ 0.6	44.7 $\pm$ 0.5	44.9 $\pm$ 0.6	44.8 $\pm$ 0.3	44.9 $\pm$ 0.6
<i>Cx. pipiens molestus</i>								
<i>Bti</i>	41.9 $\pm$ 0.4	42.2 $\pm$ 0.4	42.4 $\pm$ 0.3	42.4 $\pm$ 0.3	41.5 $\pm$ 0.4	41.7 $\pm$ 0.2	41.8 $\pm$ 0.2	42.0 $\pm$ 0.5
Control	41.6 $\pm$ 0.5	41.9 $\pm$ 0.4	42.2 $\pm$ 0.5	42.1 $\pm$ 0.3	41.6 $\pm$ 0.3	41.7 $\pm$ 0.4	42.0 $\pm$ 0.3	42.1 $\pm$ 0.1
DFB	41.7 $\pm$ 0.3	41.9 $\pm$ 0.3	42.3 $\pm$ 0.5	42.1 $\pm$ 0.3	41.5 $\pm$ 0.3	41.7 $\pm$ 0.4	41.8 $\pm$ 0.2	42.2 $\pm$ 0.1
<i>Cx. pipiens pipiens</i>								
<i>Bti</i>	42.0 $\pm$ 0.5	42.1 $\pm$ 0.5	42.4 $\pm$ 0.2	42.5 $\pm$ 0.4	41.5 $\pm$ 0.3	41.7 $\pm$ 0.7	41.5 $\pm$ 0.6	42.0 $\pm$ 0.9
Control	41.5 $\pm$ 0.4	41.7 $\pm$ 0.7	42.0 $\pm$ 0.6	42.3 $\pm$ 0.5	41.5 $\pm$ 0.7	41.6 $\pm$ 0.4	42.1 $\pm$ 0.3	42.2 $\pm$ 0.3
DFB	41.7 $\pm$ 0.6	42.0 $\pm$ 0.5	42.3 $\pm$ 0.5	42.1 $\pm$ 0.5	41.3 $\pm$ 0.4	41.8 $\pm$ 0.5	42.1 $\pm$ 0.4	42.1 $\pm$ 0.4

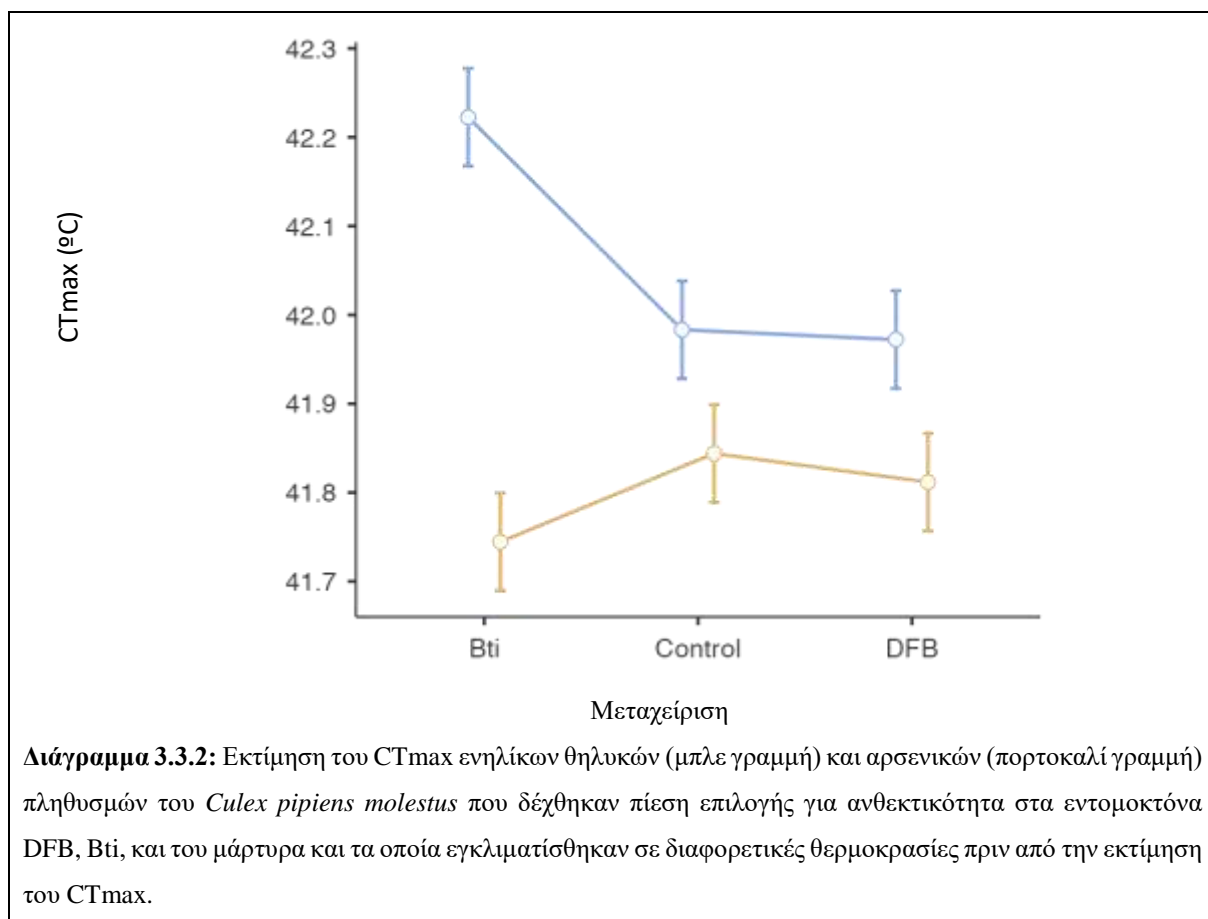
Η ανάλυση συμπαράταξης έδειξε ότι ή θερμοκρασία εγκλιματισμού, η μεταχείριση και το φύλο ήταν σημαντικοί εκτιμητές του CT<sub>max</sub> των ενηλίκων όπως και οι αλληλεπιδράσεις μεταχείριση με το φύλο και θερμοκρασία εγκλιματισμού με τη μεταχείριση (Πίνακας 3.3.2).

**Πίνακας 3.3.2:** Ανάλυση συνδιακύμανσης για την επίδραση της επιλογής για ανθεκτικότητα στο DFB και στο Bti και του φύλου στο σημείο υψηλής θερμοκρασίας (CTmax) ενηλίκων του *Culex ripiens ripiens*.

Πηγή παραλλακτικότητας	Άθροισμα τετραγώνων	df	Μέσο τετράγωνο	F	p
Θερμοκρασία εγκλιματισμού (oC)	11.954	1	11.954	48.283	< .001
Επιλογή για ανθεκτικότητα	0.417	2	0.208	0.841	0.432
Φύλο	5.373	1	5.373	21.702	< .001
Επιλογή για ανθεκτικότητα X Φύλο	3.271	2	1.636	6.606	0.002
Residuals	57.687	233	0.248		

### 3.3.2 *Culex ripiens molestus*

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3.3.2 οι τιμές του CTmax επηρεάστηκαν από τη θερμοκρασία εγκλιματισμού όχι όμως από την επιλογή για ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα DFB και Bti.. Το CTmax των ατόμων που είχαν εγκλιματιστεί στους 15 °C ήταν περίπου 1,5 °C χαμηλότερο από εκείνο των ατόμων που είχαν εγκλιματιστεί στους 30 °C. Στον Πίνακα 3.2.3 δίνονται οι μέσες τιμές του CTmax.



Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η θερμοκρασία εγκλιματισμού και το φύλο ήταν εκτιμητές του CTmax των ενηλίκων για το βιότυπο *Cx. pipiens molestus* (Πίνακας 3.3.2).

**Πίνακας 3.3.3** Ανάλυση συνδιακύμανσης για την επίδραση της επιλογής για ανθεκτικότητα στο DFB και στο Bti και του φύλου στο σημείο υψηλής θερμοκρασίας (CTmax) ενηλίκων του *Culex pipiens molestus*.

Πηγή παραλλακτικότητας	Άθροισμα τετραγώνων	df	Μέσο τετράγωνο	F	p
Θερμοκρασία εγκλιματισμού (οC)	10.210	1	10.210	84.38	< .001
Μεταχείριση	0.366	2	0.183	1.51	0.223
Sex	4.033	1	4.033	33.33	< .001
Μεταχείριση * Sex	1.440	2	0.720	5.95	0.003
Residuals	28.192	233	0.121		

### 3.3.3 Σύγκριση του σημείου CTmax μεταξύ των δύο βιοτύπων του *Culex pipiens*

Η ανάλυση παραλλακτικότητας των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η θερμοκρασία εγκλιματισμού και το φύλο ήταν σημαντικοί εκτιμητές του CTmax των ενηλίκων, σε αντίθεση με το υποείδος (Πίνακας 3.2.4).

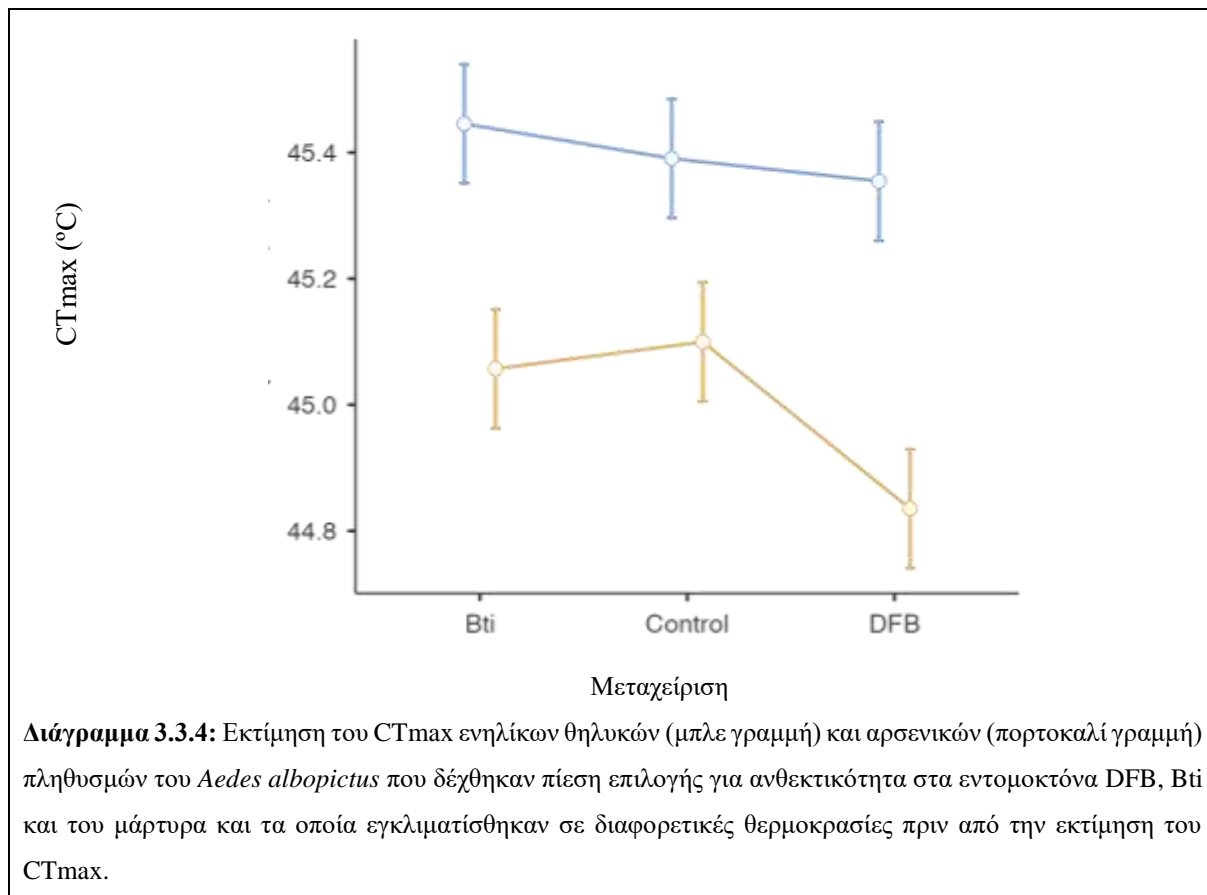
**Πίνακας 3.3.4** Ανάλυση συνδιακύμανσης για την επίδραση της θερμοκρασίας εγκλιματισμού της επιλογής για ανθεκτικότητα στο DFB και στο Bti, του φύλου και του βιοτύπου στο CTmax ενηλίκων του *Culex pipiens*.

Πηγή παραλλακτικότητας	Sum of Squares	df	F	p
Θερμοκρασία εγκλιματισμού (°C)	22.1299	1	120.292	< .001
Είδος κουνουπιού	0.0546	1	0.297	0.586
Sex	9.3577	1	50.865	< .001
Μεταχείριση	0.5768	2	1.568	0.210
Είδος κουνουπιού * Sex	0.0480	1	0.261	0.610
Είδος κουνουπιού * Μεταχείριση	0.2057	2	0.559	0.572
Sex * Μεταχείριση	4.4318	2	12.045	< .001
Είδος κουνουπιού * Sex * Μεταχείριση	0.2793	2	0.759	0.469
Residuals	85.9135	467		

### 3.3.4 *Aedes albopictus*

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3.3.2 οι τιμές του CTmax επηρεάστηκαν από τη θερμοκρασία εγκλιματισμού όχι όμως από την επιλογή για ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα DFB και Bti. Το CTmax των ατόμων που είχαν εγκλιματιστεί στους 15 °C ήταν περίπου 1,5 °C χαμηλότερο από

εκείνο των ατόμου που είχαν εγκλιματιστεί στους 30 °C. Στον Πίνακα 3.3.2 δίνονται οι μέσες τιμές του CTmax.



Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι μόνο η θερμοκρασία εγκλιματισμού και το φύλο ήταν οι δύο σημαντικοί εκτιμητές του CTmax των ενηλίκων του *Ae. albopictus* (Πίνακας 3.3.5).

**Πίνακας 3.3.5** Ανάλυση συνδιακύμανσης για την επίδραση της επιλογής για ανθεκτικότητα στο DFB και στο Bti και του φύλου στο CTmax ενηλίκων του *Aedes albopictus*.

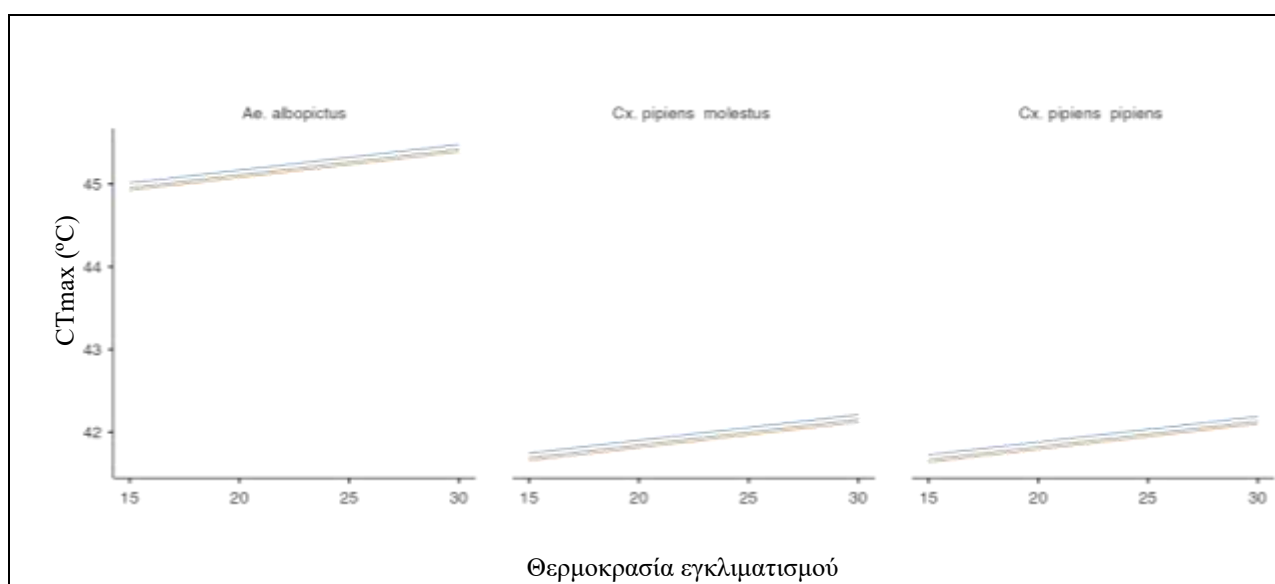
Πηγή παραλλακτικότητας	Άθροισμα τετραγώνων	df	Μέσο τετράγωνο	F	p
Θερμοκρασία εγκλιματισμού (oC)	1.928	1	1.928	5.419	0.021
Μεταχείριση	1.255	2	0.628	1.764	0.174
Sex	9.576	1	9.576	26.915	<.001
Μεταχείριση * Sex	0.526	2	0.263	0.739	0.479
Residuals	82.898	233	0.356		

### 3.3.5 Σύγκριση του CTmax μεταξύ των δύο βιοτύπων του *Culex ripiens* και του *Aedes albopictus*

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η θερμοκρασία εγκλιματισμού, το είδος κουνουπιού και το φύλο ήταν σημαντικοί εκτιμητές του CTmax. Όλες οι αλληλεπιδράσεις δεν ήταν σημαντικές (Πίνακας 3.3.6). Το CTmax ήταν υψηλότερο στο *Ae. albopictus* ακολουθούμενο από το *Cx. ripiens molestus* και τέλος από το *Cx. ripiens ripiens*.

**Πίνακας 3.3.6** Αποτελέσματα γενικευμένου γραμμικού μοντέλου για την επίδραση του είδους, του φύλου, της θερμοκρασίας εγκλιματισμού και της επιλογής για ανθεκτικότητα στο DFB και στο Bti στο CTmax ενηλίκων του *Aedes albopictus* και των δύο βιοτύπων του *Culex ripiens*.

	$\chi^2$	df	p
Θερμοκρασία εγκλιματισμού (°C)	87.21	1	< .001
Είδος κουνουπιού	6956.53	2	< .001
Sex	74.27	1	< .001
Είδος κουνουπιού * Sex	2.53	2	0.282
Θερμοκρασία εγκλιματισμού (°C) * Είδος κουνουπιού	10.27	2	0.006
Θερμοκρασία εγκλιματισμού (°C) * Sex	2.31	1	0.128



**Διάγραμμα 3.3.4:** Εκτίμηση του CTmax ενηλίκων πληθυσμών του *Aedes albopictus* και των *Culex ripiens* που δέχθηκαν πίεση επιλογής για ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα DFB (πορτοκαλί γραμμή), Bti (μπλε γραμμή) και του μάρτυρα (γκρι γραμμή) και τα οποία εγκλιματίστηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες πριν από την εκτίμηση του CTmax.



#### 4. Συζήτηση και Συμπεράσματα

Τα περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά παίζουν καθοριστικό ρόλο στην επέκταση της γεωγραφικής κατανομής τόσο του *Ae. albopictus* όσο και του κοινού κουνουπιού *Cx. pipiens*. Προκειμένου να προβλεφθεί η μελλοντική του εξάπλωση, δεδομένων των διαφορετικών κλιματικών συνθηκών στην Ευρώπη και των κλιματικών αλλαγών που συμβαίνουν, είναι πολύ σημαντικό να καταγραφούν τα όρια αντοχής σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις. Η θερμοκρασία φαίνεται να είναι ο σημαντικότερος παράγοντας για την εξάπλωση του *Ae. albopictus* (Brugueras et al., 2020).

Επιπλέον, κουνούπια του γένους *Culex* που μεταδίδουν επίσης σοβαρές ασθένειες, έχουν καταγραφεί στη χώρα μας. Μέχρι το 2017, οι χώρες με τον υψηλότερο αριθμό κρουσμάτων ήταν η Ελλάδα, η Ιταλία, η Ρουμανία και η Ουγγαρία (ECDC), γεγονός που δείχνει ανάγκη για μια ολοκληρωμένη προσέγγιση για την αντιμετώπιση της διαχείρισης τέτοιων ασθενειών πέρα από τα σύνορα των χωρών και των ηπείρων.

##### 4.1 Η σημαντικότητα του σημείου υπέρψυξης (Super cooling point) στα ενήλικα.

Πειραματικά αποτελέσματα σε διαχειμάζοντα και μη ενήλικα θηλυκά *Culex pipiens* ύστερα από έκθεσή τους σε θερμοκρασίες υπέρψυξης, δεν έδειξαν διαφορές στις θερμοκρασίες μεταξύ τους. Ακόμη και τα ενήλικα που είχαν επέλθει σε διαχείμαση πέθαναν μετά από παρατεταμένη έκθεση στους 5 °C, θερμοκρασία πολύ πάνω από το καταγεγραμμένο σημείο υπερψύξης. Τα SCP που καταγράφηκαν ήταν από -15°C έως -16°C (Rinehart et al., 2006), θερμοκρασίες υψηλότερες από τις αντίστοιχες που καταγράφηκαν στην παρούσα διατριβή.

Το *Ae. albopictus* δεδομένου του ότι διαχειμάζει ως αυγό και οι θερμοκρασίες στις οποίες είναι ενεργό διαφέρουν κατά πολύ από το *Culex pipiens*, μιας που προέρχεται από πιο εύκρατα κλίματα, τα πειραματικά δεδομένα του για SCP αφορούν τις περιπτώσεις των αυγών και σε θερμοκρασίες που αγγίζουν τους -20°C (Hanson and Craig, 1995). Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή οι θερμοκρασίες αυτές βρέθηκαν σαφώς υψηλότερες και η επίδραση της επιλογής για ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα δεν ήταν σημαντικός εκτιμητής του SCP των ενηλικών του *Ae. albopictus* σε αντίθεση με το φύλο.

Οι φαινομενικά χαμηλές χειμερινές τιμές του SCP (-16 °C έως -17 °C) που παρατηρήθηκαν σε πειράματα στα θηλυκά *Culex pipiens* πιθανότατα έχουν μικρή προσαρμοστική σημασία για τη διαχείμασή τους το χειμώνα. Επομένως το SCP καθορίζεται από φυσιολογικούς παράγοντες

που δεν σχετίζονται με τη διαχείμαση. Η εποχική πτώση των τιμών SCP σε καλά προσαρμοσμένα, πραγματικά ανθεκτικά στο κρύο έντομα που βασίζονται σε βαθιά υπέρψυξη, μπορεί να φτάσει τους  $-54\text{ }^{\circ}\text{C}$  και συνήθως συνοδεύεται από σημαντικές απώλειες σωματικού νερού ή συσσώρευσης υψηλών συγκεντρώσεων μεταβολιτών ή και τα δύο. Το χαμηλότερο όριο θερμοκρασίας για την επιβίωσή του βρίσκεται πολύ πιο ψηλά από το SCP, μεταξύ  $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  και  $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ωστόσο, ακόμη και αυτό το επίπεδο αντοχής στο κρύο είναι αρκετό για να προστατεύσει τα θηλυκά από τη θνησιμότητα σε πιθανές χαμηλές θερμοκρασίες που μπορεί να εμφανιστούν στους περισσότερους υπόγειους βιότοπους (Rozsypal et al., 2021).

#### 4.2 Κριτικά σημεία ελάχιστων θερμοκρασιών (CT<sub>min</sub>).

Η χειμερινή θερμοκρασία είναι ένας σημαντικός περιορισμός για την εξάπλωση του *Ae. albopictus* προς τα βόρεια, με τα όρια εύρους να βρίσκονται μεταξύ των  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  και  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Armstrong et al., 2017). Οι χειμερινές θερμοκρασίες περιορίζουν το εύρος της γεωγραφικής κατανομής του *Ae. albopictus* σε περιοχές με θερμοκρασίες πάνω από  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  για να επιτρέψουν την επιβίωση των αυγών και μετέπειτα την επιβίωση των ενηλίκων μετά το χειμώνα (Thomas et al., 2012). Απαιτείται μέση ετήσια θερμοκρασία πάνω από  $11\text{ }^{\circ}\text{C}$  για να επιβιώσουν τα ενήλικα (Caminade et al., 2012).

Τα αποτελέσματα της παρούσα μεταπτυχιακής διατριβή έδειξαν ότι στα άτομα που είχαν εγκλιματιστεί στους  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  υπήρχε εμφανείς διαφορά θερμοκρασίας περίπου  $1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  από εκείνο των ατόμων που είχαν εγκλιματιστεί στους  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Οι τιμές των αποτελεσμάτων των πειραμάτων του CT<sub>min</sub> επηρεάστηκαν από τη θερμοκρασία εγκλιματισμού και το φύλο, στο *Cx. ripiens ripiens*, ενώ στα *Cx. ripiens molestus* και *Ae. albopictus* οι τιμές επηρεάστηκαν από τη θερμοκρασία εγκλιματισμού.

#### 4.3 Κριτικά σημεία μέγιστων θερμοκρασιών (CT<sub>max</sub>).

Τα αποτελέσματα της παρούσα μεταπτυχιακής διατριβή έδειξαν ότι οι τιμές των αποτελεσμάτων του CT<sub>max</sub> επηρεάστηκαν από τη θερμοκρασία εγκλιματισμού και το φύλο, στο *Cx. ripiens ripiens*, ενώ στα *Cx. ripiens molestus* και *Ae. albopictus* οι τιμές επηρεάστηκαν από τη θερμοκρασία εγκλιματισμού.

Η βέλτιστη καλοκαιρινή θερμοκρασία για την εγκατάσταση του *Ae. albopictus* κυμαίνεται από  $25$  έως  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , θερμοκρασίες που απαντώνται σε χώρες της λεκάνης της Μεσογείου (Caminade et al., 2012).

Η θερμοκρασία είναι μια από τις πιο σημαντικές μεταβλητές για την εξάπλωση του γένους *Culex* (Marini et al., 2016). Υπάρχει ένα βέλτιστο εύρος θερμοκρασιών (25–35 °C) για την ανάπτυξη των κουνουπιών (Mulatti et al., 2014) και η ανάπτυξη των *Cx. pipiens* δεν μπορεί να ολοκληρωθεί κάτω από τους 7 °C. Τόσο η ανάπτυξη των προνυμφών όσο και η επιβίωση των ενηλίκων είναι μικρότερη σε υψηλότερες θερμοκρασίες πάνω των 25 °C (Marini et al., 2016). Η θερμοκρασία, επομένως, μπορεί να είναι καλός προγνωστικός παράγοντας της εμφάνισής του.

Οι υψηλότερες θερμοκρασίες των ενηλίκων του *Culex. pipiens* είχαν ως αποτέλεσμα υψηλότερο CTmax. Τα κουνούπια με το υψηλότερο CTmax ήταν αυτά που είχαν διατηρηθεί σε όλη τους τη ζωή στους 26 C, ενώ εκείνα με το χαμηλότερο CTmax είχαν παραμείνει στους 18 C (Gray, 2013). Όσον αφορά τις διαφορές που παρατηρήθηκαν ανάμεσα στους δύο βιοτόπους *Culex. pipiens pipiens* και *Culex. pipiens molestus*, κάτι ανάλογο έχει καταγραφεί και σε μια μελέτη (Vorhees et al., 2013). που συνέκρινε τα χαρακτηριστικά γεωγραφικά διακριτών πληθυσμών του *Culex. tarsalis*, ενός είδους που σχετίζεται στενά με το *Culex. pipiens*. Βρήκαν ότι το CTmax διαφέρει σημαντικά μεταξύ των πληθυσμών έως και 1,5 αποτέλεσμα το οποίο καταγράφηκε και στην παρούσα διατριβή. Λαμβάνοντας υπόψη την ικανότητα των κουνουπιών να μεταναστεύουν πολλά χιλιόμετρα κάθε μέρα και να μεταφέρονται από τον άνεμο, η ροή γονιδίων μεταξύ των τοπικών πληθυσμών που ζουν σε διαφορετικά θερμικά περιβάλλοντα μπορεί να είναι εκτεταμένη. Επομένως, η φαινοτυπική πλαστικότητα είναι πιθανό να διαδραματίσει μεγάλο ρόλο στο να επιτρέψει στα άτομα να επιβιώσουν σε μια ποικιλία απρόβλεπτων ενδιαιτημάτων (Gray, 2013). Η επέκταση της μελέτης των επιπτώσεων εγκλιματισμού σε πολύπλοκους κύκλους ζωής όπως είναι αυτός του κουνουπιού που περνάει μόνο τα ανήλικα στάδια μέσα στο νερό, είναι απαραίτητη για την περαιτέρω κατανόηση του τρόπου με τον οποίο η περιβαλλοντική μεταβλητότητα ρυθμίζουν την εξέλιξη της φαινοτυπικής πλαστικότητας στους πληθυσμούς.

#### 4.4 Μειωμένη ανθεκτικότητα στο *Bti* και στο DFB στους πληθυσμούς κουνουπιών.

Σχετικά με τη μειωμένη ανθεκτικότητα στο *Bti* σε πληθυσμούς κουνουπιών σε εργαστηριακά στελέχη, *Cx. pipiens* και *Ae. aegypti*, τα άτομα ανθεκτικά στο *Bti* εμφάνισαν εκτεταμένη ανάπτυξη προνυμφών, χαμηλότερη γονιμότητα θηλυκών και μειωμένη επιβίωση αυγών απουσία *Bti* σε σύγκριση με τα γονικά στελέχη. Επιπλέον, η ανθεκτικότητα εξαφανίστηκε μόνο μετά από τρεις (*Cx. pipiens*) και έξι (*Ae. aegypti*) γενιές χωρίς επιλογή (Brühl et al., 2020).

Μετά από έως και 30 γενιές έκθεσης με το *Bti*, έχει βρεθεί 3,5 φορές υψηλότερη ανάπτυξη ανθεκτικότητας, πράγμα που σημαίνει ότι χρειαζόταν 3,5 φορές υψηλότερη δόση *Bti* για να σκοτωθούν τα ανθεκτικά κουνούπια. Το παρατηρούμενο χαμηλό επίπεδο αντίστασης στο *Bti* αποδίδεται εν μέρει στους διαφορετικούς υποδοχείς του εντέρου για τις τρεις τοξίνες *Cry* και σχετίζεται κυρίως με την παρουσία *Cyt* τοξίνη (Soberon et al., 2013).

Μέχρι σήμερα, πολύ λίγες μελέτες έχουν διεξαχθεί που αποκαλύπτουν την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα κουνούπια έναντι του DFB. Σε ιταλικό στέλεχος *Cx. pipiens*, έχουν αποδειχθεί υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας και μάλιστα το ποσοστό τους ανεβαίνει αρκετά κάθε έτος. Ο φαινότυπος βρέθηκε συνδεδεμένος με τη μετάλλαξη της χιτίνης γονίδιο συνθετάσης στο αμινοξύ I1043 (I1043M και I1043L). Από την ανασκόπηση και τις πηγές της βιβλιογραφίας, η χρήση συνδυασμών diflubenzuron μαζί με άλλες ουσίες φαίνεται να είναι περιορισμένη και απαιτείται περαιτέρω αξιολόγηση από την επιστημονική κοινότητα ως μια ισχυρή εναλλακτική λύση ελέγχου για τα κουνούπια (Sankar and Kumar, 2021).

Στην παρούσα διατριβή, οι τιμές των αποτελεσμάτων δεν επηρεάστηκαν σε μεγάλο βαθμό από την επιλογή για ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα. Στο *Cx pipiens pipiens* τιμές του ήταν ελαφρώς υψηλότερες στον πληθυσμό που είχε δεχθεί επιλογή για ανθεκτικότητα στο *Bti*. Στο *Cx pipiens molestus* οι τιμές δεν επηρεάστηκαν από την επιλογή για ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα DFB και *Bti* κάτι το οποίο συνέβη και στο *Ae. albopictus*

Επομένως φαίνεται αρκετά ρεαλιστικό το επικρατέστερο σενάριο μέχρι σήμερα που είναι η εξάπλωση των *Ae. albopictus* και *Cx. pipiens* προς μελλοντικά κατάλληλες περιοχές που αυτή τη στιγμή είναι απαλλαγμένες από τις ασθένειές τους, δεδομένων των κλιματικών συνθηκών που ευνοούν την εξάπλωσή τους, αλλά και την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα μέχρι τώρα χρησιμοποιούμενα σκευάσματα.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abd, S. (2020). *Life Cycle and Development of Diptera, Life Cycle and Cytogenetic Study of Mosquitoes (Diptera: Culicidae)*. DOI: 10.5772/intechopen.93219

Adamo, S. A., Baker, J. L., Lovett, M.M. E. and Wilson, G. (2012). Climate Change and Temperate Zone Insects: *The Tyranny of Thermodynamics Meets the World of Limited Resources*. Entomological Society of America. 41(6):1644-1652

Armstrong P. M., Andreadis T. G., Shepard J. J., Thomas M. C. (2017). Northern range expansion of the Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*): *Analysis of mosquito data from Connecticut, USA*

Becker, N., Petric, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M., Dahl, C., and Kaiser A. (2010). *Mosquitoes and Their Control*. Springer, Berlin

Bittel J. (2016). National Geographic. *Zika raises the question: are mosquitoes necessary?* February

Brugueras, S., Fernandez-Martínez, B., Martínez-de la Puente, J., Figuerola, J., Montalvo Porro, T., Rius, C., Larrauri, A. and Gomez-Barroso, D. (2020). *Environmental drivers, climate change and emergent diseases transmitted by mosquitoes and their vectors in southern Europe: A systematic review, Spain*. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110038>

Brühl, C. A., Després L., Frör O., Patil, D. C., Poulin, B., Tetreau, G., Allgeier S. (2020). *Environmental and socioeconomic effects of mosquito control in Europe using the biocide *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* (Bti)*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137800>

Caminade, C., Medlock, J.M., Ducheyne, E., McIntyre, K.M., Leach, S., Baylis, M., Morse, A.P., (2012). *Suitability of European climate for the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*: recent trends and future scenarios*. J. R. Soc. Interface 9, 2708–2717.

Couper, L., I., Farner, J., E, Caldwell, J., M., Child, M., L, Harris, M., J., Kirk, D., G., Nova, N., Shocket, M., Skinner, E., B, Uricchi., L., H., Exposito-Alonso, M. and Mordecai, E., A. (2021). *How will mosquitoes adapt to climate warming?*. eLife 2021;10:e69630. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.69630>

ECDC, Surveillance atlas of infectious diseases. <https://www.ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases>

Fang, J. (2010). *A World Without Mosquitoes*. Nature. Vol 466:432-434

Fotakis, E. A, Chaskopoulou, A., Grigoraki, L., Tsiamantas, A., Kounadi, S., Georgiou, L. and Vontas, J. (2017). *Analysis of population structure and insecticide resistance in mosquitoes of the genus Culex, Anopheles and Aedes from different environments of Greece with a history of mosquito borne disease transmission*. Acta Tropica. Volume 174:29-37.

Gray E. M. (2013). *Thermal acclimation in a complex life cycle: the effects of larval and adult thermal conditions on metabolic rate and heat resistance in Culex pipiens (Diptera: Culicidae)*. Journal of Insect Physiology. Vol. 59, Issue 10, pp. 1001-1007

Harbach, P. E. (2012). *Culex pipiens: species versus species complex – Taxonomic history and perspective*. The American Mosquito Control Association, Inc

Hanson S. M. and Craig G. B. Jr . (1995). *Relationship between cold hardiness and supercooling point in Aedes albopictus eggs*. J. Am. Mosq. Control Assoc.11: 35–38

Harrison, R., E., Brown, M., R. and Strand, M., R. (2021). *Whole blood and blood components from vertebrates differentially affect egg formation in three species of anautogenous mosquitoes*. Parasites Vectors. 14:119 <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04594-9>

Hemingway., J. and Ranson., H. (2000). *Insecticide resistance in insect vectors of human disease*. Annu Rev Entomol 45:371–391

Illinois Department of Public Health, (2017). *Prevention and Control: Mosquitoes and Disease*. Διαθέσιμο σε: <http://www.idph.state.il.us/envhealth/pcmosquitoes.htm>

Ioannou, C.S.; Hadjichristodoulou, C.; Kyritsi, M.A.; Papadopoulos, N.T. (2021). *Short term selection to Diflubenzuron and Bacillus thuringiensis var. israelensis differentially affects the winter survival of Culex pipiens f. pipiens and Culex pipiens f. molestus (Diptera: Culicidae)*. Insects , 12, 527

Ioannou, C.S.; Hadjichristodoulou, C.; Mouchtouri, V. A., Papadopoulos, N.T. (2021) *Effects of Selection to Diflubenzuron and Bacillus thuringiensis var. israelensis on the Overwintering Successes of Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) Insects*, 12, 822. <https://doi.org/10.3390/insects12090822>

Kolimenakis, A., Latinopoulos, D., Bithas, K., Richardson, C., Lagouvardos, K., Stefopoulou, A., Papachristos, D. and Michaelakis, A. (2019). *Exploring Public Preferences, Priorities, and Policy Perspectives for Controlling Invasive Mosquito Species in Greece*. *Tropical Medicine and Infectious Disease*. 4(83):1-13

Lehane, M., J. (2005). *The Biology of Blood-Sucking in Insects* .Second Edition. Cambridge University Press, New York

Margalit, J. and Dean, D., (1985). *The story of Bacillus thuringiensis var. israelensis (B.t.i.)*.J. Am. Mosq, CoNrnol Assoc. Vol 1, No. 1

Marini, G., Poletti, P., Giacobini, M., Pugliese, A., Merler, S., Rosa, R., (2016). *The role of climatic and density dependent factors in shaping mosquito population dynamics: the case of Culex pipiens in northwestern Italy*. PloS One 11

Mordecai, E. A., Caldwell, J. M., Grossman, M. K., Lippi, C. A., Johnson, L. R., Neira M., Rohr, J. R., Ryan, S. J., Savage, V., Shocket, M. S., Sippy, R., Stewart Ibarra, A. M., Thomas, M. B. and Villena, O. (2019). *Thermal biology of mosquito-borne disease*. *Ecology Letters*,. 22(10):1690-1708

Mulatti, P., Ferguson, H.M., Bonfanti, L., Montarsi, F., Capelli, G., Marangon, S., (2014). *Determinants of the population growth of the West Nile virus mosquito vector Culex pipiens in a repeatedly affected area in Italy*. *Parasites Vectors* 7, 26

Mullen, G., R. and Durden L., A. (2019). *Medical and Veterinary Entomology*. Third Edition..Department of Entomology and Plant Pathology. Mississippi State University. United States

Nelson, W., A., Keirans, J., E., Bell, J., F. and Clifford, C. M. (1975). *Host-Ectoparasite Relationships*. *Journal of Medical Entomology*. Vol. 12, no. 2: 143-166

Paaijmans, K. P., Heinig, R. L., Seliga, R. A., Blanford, J. I., Blanford, S., Murdock, C. C. and Thomas, M. B. (2013). *Temperature variation makes ectotherms more sensitive to climate change*. *Global Change Biology*. (19):2373-2380. doi: 10.1111/gcb.12240

Paris, M., Tetreau, G., Laurent, F., Lelu, M., Despres., L. and David, J. P. (2011). *Persistence of Bacillus thuringiensis israelensis (Bti) in the environment induces resistance to multiple Bti toxins in mosquitoes*. *Pest Management Science*, July 67:122-128

Prudêncio, M. (2020). *In Fairness to Mosquitoes*. *Trends in Parasitology*. (Vol. 36, No. 11:876-877)

Reid., M. C. and McKenzie., F. E., (2016). *The contribution of agricultural insecticide use to increasing insecticide resistance in African malaria vectors*. *Malaria Journal*. 15:107. DOI 10.1186/s12936-016-1162-4

Reiter, P. (2001). *Climate Change and Mosquito-Borne Disease*. *Environmental Health Perspectives*. Vol 109 (1): 141-161

Robinson, W., H. (2005). *Urban Insects and Arachnids. A Handbook of Urban Entomology*. Cambridge University Press. New York

Samanidou -Voyadjoglou, A. and Darsie, R., F., Jr. (1993). *An annotated checklist and bibliography of the mosquitoes of Greece*. *Mosq.Syst.*25:177-185

Rozsypal J., Moos M., Rudolf I. and K (2021). *Do energy reserves and cold hardiness limit winter survival of Culex pipiens?* Vol. 255, 110912

Rinehart J. P., Robich R. M. and Denlinger D. L.(2006) *Enhanced Cold and Desiccation Tolerance in Diapausing Adults of Culex pipiens, and a Role for Hsp70 in Response to Cold Shock but Not as a Component of the Diapause Program*. *Journal of Medical Entomology*, Vol. 43, Issue 4, 1 pp. 713–722

Sankar, M. and Kumar, S. (2021). *A systematic review on the eco-safe management of mosquitoes with diflubenzuron: An effective growth regulatory agent*. *Ecological Society of China, India*

Service, M. (2012). *Medical Entomology for Students*. Cambridge University Press, 5th Edition



Soberon, M., Lopez-Diaz, J.A., Bravo, A., (2013). *Cyt toxins produced by Bacillus thuringiensis: a protein fold conserved in several pathogenic microorganisms*. Peptides 41, 87–93

Thomas, S.M., Obermayr, U., Fischer, D., Kreyling, J., Beierkuhnlein, C. (2012). *Low temperature threshold for egg survival of a post-diapause and non-diapause European aedine strain, Aedes albopictus (Diptera: Culicidae)*. Parasites Vectors 5, 100. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-100>

Vorhees A. S., Gray E. M. and Bradley T. J.(2013) *Thermal Resistance and Performance Correlate with Climate in Populations of a Widespread Mosquito*. Physiological and Biochemical Zoology. Vol 86, No 1

Ζιώγας, Β. Ν. και Μαρκόγλου Α. Ν. (2007). *Γεωργική Φαρμακολογία. Βιοχημεία, Μηχανισμοί Δράσης και Χρήσεις των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων*. Ελληνικές Εκδόσεις, Ζιώγας Β., Α. Μαρκόγλου

Τζανακάκης Ε Μ και Κωβαίος Σ. Δ. (1995). *Εντομολογία*. University studio press

ΥΠΑΑΤ [Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης Και Τροφίμων]. (2020). Γενική Δ/Νση Γεωργίας Δ/Νση Προστασίας Φυτικής Παραγωγής Τμήμα Βιοκτόνων Προϊόντων. «*Εγκεκριμένα βιοκτόνα σκευάσματα για την αντιμετώπιση των κουνουπιών*, Αθήνα, [http://www.minagric.gr/syspest/syspest\\_bycat\\_byactive.aspx](http://www.minagric.gr/syspest/syspest_bycat_byactive.aspx)

Υπουργείο Υγείας. (2020). Γενική Δ/Νση Δημόσιας Υγείας Και Ποιότητας Ζωής Δ/Νση Δημόσιας Υγείας Και Υγιεινής Περιβάλλοντος, Τμήμα Μεταδοτικών Νοσημάτων. *Προγράμματα καταπολέμησης των κουνουπιών, σχέδιο δράσης, σχετική ενημέρωση και προφύλαξη του κοινού για το έτος 2020.*, Αθήνα