

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΩΝ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ
ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *CULEX* ΚΑΙ *AEDES* ΠΟΥ ΕΝΔΗΜΟΥΝ ΣΤΗ ΘΕΣΣΑΛΙΑ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ Δ. ΜΑΣΤΡΟΝΙΚΟΛΟΣ
ΓΕΩΠΟΝΟΣ

Ν. ΙΩΝΙΑ ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ, ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2023

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΩΝ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ
ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *CULEX* ΚΑΙ *AEDE*S ΠΟΥ ΕΝΔΗΜΟΥΝ ΣΤΗ ΘΕΣΣΑΛΙΑ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ Δ. ΜΑΣΤΡΟΝΙΚΟΛΟΣ

Η διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του
Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Ν. Θ. Παπαδόπουλος
Χ. Γ. Αθανασίου
Χ. Σπ. Χατζηχριστοδούλου

Καθηγητής
Καθηγητής
Καθηγητής

Εισηγητής
Μέλος
Μέλος

Επταμελής εξεταστική επιτροπή

Ν. Θ. Παπαδόπουλος
Χ. Γ. Αθανασίου
Χ. Σπ. Χατζηχριστοδούλου
Ν. Θ. Νάκας
Ε. Β. Πατσουλά
Γ. Θ. Κολιόπουλος
Α. Ν. Μιχαηλάκης

Καθηγητής
Καθηγητής
Καθηγητής
Καθηγητής
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Επίκουρος Καθηγητής
Ερευνητής Α'

Εισηγητής
Μέλος
Μέλος
Μέλος
Μέλος
Μέλος
Μέλος

Ν. ΙΩΝΙΑ ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ, ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2023

ΠΡΟΛΟΓΟΣ- ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	8
1.1 Κουνούπια και η σημασία τους στη δημόσια υγεία	19
1.1.1 Ταξινόμηση	20
1.1.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά των κουνουπιών	22
1.1.3 Βιολογικός κύκλος και βιολογία	27
1.1.4 Κουνούπια διαβιβαστές σημαντικών ασθενειών	30
1.2 Η σημασία των κουνουπιών για τη χώρα μας	34
1.2.1 Τα σημαντικότερα κουνούπια της Ελλάδας	34
1.2.2 Τα σημαντικότερα είδη κουνουπιών της Θεσσαλίας	39
1.3 Το κοινό κουνούπι και οι βιότοποί του	43
1.3.1 Ταξινομική θέση	43
1.3.2 Βιολογία του <i>Cx. pipiens</i>	46
1.4 Το ασιατικό κουνούπι τίγρης <i>Ae. albopictus</i>	51
1.4.1 Ταξινομική θέση	51
1.4.2 Βιολογία του <i>Ae. albopictus</i>	53
1.5 Αντιμετώπιση κουνουπιών	55
1.5.1 Διαχείριση των εστιών αναπαραγωγής	56
1.5.2 Μαζική παγίδευση και θανάτωση	56
1.5.3 Βιολογική αντιμετώπιση κουνουπιών	57
1.5.4 Χημική αντιμετώπιση κουνουπιών	59
1.5.5 Τεχνική Στείρων Εντόμων (Sterile Insect Technique – SIT)	63
1.5.6 Χρήση διαγονιδιακών κουνουπιών	65
1.6 Σκοπός της παρούσας διατριβής	68
2 ΓΕΝΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	73
2.1 Εργαστηριακές συνθήκες	73
2.2 Πληθυσμοί που χρησιμοποιήθηκαν και μέθοδος εκτροφής τους	73

2.2.1	<i>Culex pipiens</i> sp.	73
2.2.2	<i>Aedes albopictus</i>	74
2.3	Εκτροφή κουνουπιών	78
2.3.1	<i>Culex</i> sp.	78
2.3.2	<i>Aedes albopictus</i>	81
2.4	Διαχείριση και ανάπτυξη δεδομένων	83
3	ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΝΩΣΤΙΣΜΟΥ ΠΡΟΝΥΜΦΩΝ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΝΗΛΙΚΩΝ ΣΤΑΔΙΩΝ ΚΑΙ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΤΟΥ <i>AEDES ALBOPICTUS</i> (DIPTERA: CULICIDAE)	85
3.1	Περίληψη	85
3.2	Εισαγωγή	86
3.3	Υλικά και Μέθοδοι	89
3.3.1	Εργαστηριακές συνθήκες	89
3.3.2	Έντομα και μέθοδοι εκτροφής	90
3.3.3	Επίδραση της πυκνότητας των προνυμφών και της ποσότητας τροφής στην ανάπτυξη και επιβίωση των ανήλικων σταδίων	90
3.3.4	Επίδραση της πυκνότητας των προνυμφών και της ποσότητας τροφής στη μακροβιότητα και στο μέγεθος των ενηλίκων	91
3.4	Στατιστική ανάλυση	92
3.5	Αποτελέσματα	92
3.5.1	Επιβίωση και διάρκεια ανάπτυξης των ανήλικων σταδίων	92
3.5.2	Επιβίωση και διάρκεια ανάπτυξης των ενηλίκων	100
3.6	Μέγεθος ενηλίκων	107
3.7	Συζήτηση	113
4	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΓΕΥΜΑΤΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΣΥΖΕΥΞΗΣ ΣΤΑ ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ <i>AEDES ALBOPICTUS</i>	120

4.1	Περίληψη	120
4.2	Εισαγωγή	121
4.3	Υλικά και μέθοδοι	124
4.3.1	Γενικά	124
4.3.2	Επίδραση της σύζευξης στα δημογραφικά χαρακτηριστικά	124
4.3.3	Επίδραση ενός γεύματος αίματος στα δημογραφικά χαρακτηριστικά των θηλυκών	125
4.3.4	Επίδραση δύο γευμάτων αίματος στα δημογραφικά χαρακτηριστικά του	126
4.4	Στατιστική ανάλυση	126
4.5	Αποτελέσματα	127
4.6	Συζήτηση	137
5	ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΣΤΕΙΡΩΜΕΝΩΝ ΑΡΣΕΝΙΚΩΝ ΤΟΥ <i>Aedes albopictus</i>	143
5.1	Περίληψη	143
5.2	Εισαγωγή	144
5.3	Υλικά και μέθοδοι	147
5.3.1	Πληθυσμοί κουνουπιών	148
5.3.1.1	Μαζική εκτροφή του <i>Aedes albopictus</i>	148
5.3.1.2	Ελληνικός πληθυσμός του <i>Aedes albopictus</i>	149
5.3.2	Διαχωρισμός φύλου και ακτινοβολία	150
5.3.3	Υπολειπόμενη μόλυνση του πληθυσμού με θηλυκά και ακτινοβολημένα αρσενικά	151
5.3.4	Επίδραση της μεταφοράς στα στείρωμένα αρσενικά	151
5.3.4.1	Επίδραση της διάρκειας μεταφοράς στην επιβίωση	151
5.3.4.2	Επίδραση της πυκνότητας κατά τη μεταφορά στην ικανότητα πτήσης	152
5.3.5	Επιβίωση μετά τη μεταφορά και επίδοση σύζευξης	153

5.3.2.1	Επίδραση της σύζευξης και της έλλειψης τροφής και νερού στην επιβίωση αρσενικών	153
5.3.2.2	Επίδραση της έλλειψης τροφής και νερού στα ποσοστά επιβίωσης των ενηλίκων	154
5.3.6	Εκτίμηση δυνατότητας και συχνότητας σύζευξης αρσενικού	154
5.3.6.1	Ανταγωνιστικότητα σύζευξης και ημερήσια πρότυπα της συχνότητας σύζευξης άγριων και στερωμένων αρσενικών	154
5.3.6.2	Ανταγωνιστικότητα σύζευξης αρσενικών	155
5.4	Στατιστική ανάλυση	156
5.5	Αποτελέσματα	156
5.5.1	Υπολειπόμενη μόλυνση του πληθυσμού με θηλυκά	156
5.5.2	Υπολειπόμενη γονιμότητα αρσενικών	157
5.5.3	Επίδραση της διάρκειας της μεταφοράς στην επιβίωση στερωμένων αρσενικών	158
5.5.4	Επίδραση της πυκνότητας κατά τη μεταφορά στην ικανότητα πτήσης των στερωμένων αρσενικών.	159
5.5.5.	Επίδραση της σύζευξης, της τροφής και της έλλειψης νερού στην επιβίωση των αρσενικών μετά τη μεταφορά	159
5.5.6.	Επίδοση σύζευξης αρσενικών μετά τη μεταφορά	162
5.5.6.1	Ημερήσιοι ρυθμοί της συχνότητας σύζευξης από άγρια και στερωμένα αρσενικά	162
5.5.6.2	Ανταγωνιστικότητα σύζευξης	163
5.6.	Συζήτηση	165
5.7.	Συμπεράσματα	170
6.	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΖΕΥΞΗΣ ΣΤΑ ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ <i>CX. PIPIENS</i> F. <i>PIPIENS</i> ΚΑΙ ΤΟΥ <i>CX. PIPIENS</i> F. <i>MOLESTUS</i>	171

6.1	Περίληψη	171
6.2	Εισαγωγή	172
6.3	Υλικά και μέθοδοι	176
6.4	Στατιστική ανάλυση	177
6.5	Αποτελέσματα	177
6.6	Συζήτηση	187
7	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΕΥΜΑΤΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ ΣΤΑ ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ <i>CX. pipiens</i> F. <i>pipiens</i> ΚΑΙ <i>CX. pipiens</i> F. <i>MOLESTUS</i>	191
7.1	Περίληψη	191
7.2	Εισαγωγή	192
7.3	Υλικά και μέθοδοι	194
7.3.1	Γενικά	194
7.3.1	Επίδραση των γευμάτων αίματος στα δημογραφικά χαρακτηριστικά του <i>Cx. pipiens</i> f. <i>pipiens</i> και του <i>Cx. pipiens</i> f. <i>molestus</i>	194
7.3.2	Επίδραση του γεύματος αίματος στα δημογραφικά χαρακτηριστικά των θηλυκών	195
7.4	Στατιστική ανάλυση	197
7.5	Αποτελέσματα	197
7.6	Συζήτηση	211
8	ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ, ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ, ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ, ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	217
8.1	Πρακτικές εφαρμογές των αποτελεσμάτων	225
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	227
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	246
	ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	327

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε τα έτη 2016 – 2023 στο Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Η διατριβή αποτελείται από πέντε αυτοτελή και αλληλοσυσχετιζόμενα κεφάλαια καθώς και από την εισαγωγή, τα γενικά υλικά και τις μεθόδους και την ανακεφαλαίωση. Στο κάθε κεφάλαιο υπάρχει περίληψη, εισαγωγή, υλικά και μέθοδοι, αποτελέσματα και συζήτηση.

Αισθάνομαι ειλικρινείς ευχαριστίες από καρδιάς στον καθηγητή κ. Ν. Θ. Παπαδόπουλο, επιβλέποντα της διδακτορικής μου διατριβής για το επίκαιρο θέμα που μου ανέθεσε, την εμπιστοσύνη του και την καθοδήγησή του στην εκτέλεση των πειραμάτων, στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων καθώς και στις διορθώσεις του κειμένου της διατριβής. Εκτός από την επιστήμη, λειτούργησε όχι μόνο ως μέντορας προσωπικής και επαγγελματικής ανέλιξης αλλά και ως το άτομο που προσθέτει στοιχεία που κάνουν την ειδοποιώ διαφορά, στοιχεία που θα φανούν ιδιαίτερα χρήσιμα για το μέλλον. Ιδιαίτερη σημαντική είναι η εμπιστοσύνη που μου έδειξε με τη συμμετοχή μου σε διεθνή συνέδρια και ταξίδια εκπροσωπώντας το εργαστήριο. Επίσης ευχαριστώ τους καθηγητές Χρήστος Αθανασίου και Χρήστος Χατζηχριστοδούλου, μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τις υποδείξεις και τη συμβολή τους στην παρουσίαση του κειμένου.

Ευχαριστώ για τη συμμετοχή στην εξεταστική επιτροπή τον καθηγητή Χρήστο Νάκα, την αναπληρώτρια καθηγήτρια Ελένη Πατσουλά, τον επίκουρο καθηγητή Γεώργιο Κολιόπουλο και τον ερευνητή Α Αντώνιο Μιχαηλάκη.

Ευχαριστώ θερμά τον τακτικό ερευνητή Α από το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο Δρ. Αντώνη Μιχαηλάκη για την εμπιστοσύνη και την άριστη συνεργασία μας σε επιστημονικό επίπεδο.

Ευχαριστώ τον πρώην μεταδιδακτορικό ερευνητή του εργαστηρίου Δρ. Χαράλαμπο Ιωάννου για τις πολύτιμες υποδείξεις του στην πειραματική διαδικασία και στη δημοσίευση που προέκυψε, όσο και τον Δρ. Κ. Ζάρπα για τη βοήθειά του όταν χρειάστηκε καθώς και για τις εποικοδομητικές συζητήσεις σε θέματα εντομολογίας.

Ευχαριστώ θερμά τους γεωπόνους Σαββίδου Ελένη και Πιάχα Κωνσταντίνο οι οποίοι ως προπτυχιακοί φοιτητές εκπόννησαν τις πτυχιακές τους εργασίες στο εργαστήριο και βοήθησαν στη διατήρηση των εκτροφών και στη διεξαγωγή των πειραμάτων. Ευχαριστίες εκφράζονται και για την κκ. Μ. Γιαννάκου, βοηθητικό προσωπικό του Εργαστηρίου Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Π.Θ., για την πολύτιμη βοήθεια της στην παροχή υλικοτεχνικού εξοπλισμού για την διεξαγωγή των πειραμάτων.

Ευχαριστώ θερμά τον Δρ. Γεώργιο Κρομμύδα για την τεχνική υποστήριξη στη στατιστική και στην επεξεργασία του κειμένου.

«Η διδακτορική διατριβή υλοποιήθηκε με υποτροφία του ΙΚΥ η οποία χρηματοδοτήθηκε από την Πράξη «ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ» από πόρους του ΕΠ «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», 2014-2020.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, τον αδελφό μου, και την αδελφή μου στην θερμή και διαρκή τους συμπαράσταση καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

“Έχεις τα πινέλα, έχεις τα χρώματα.

Ζωγράφισε τον παράδεισο και μπες μέσα”.

Νίκος Καζαντζάκης

ΕΥΡΕΙΑ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα κουνούπια (Diptera: Culicidae) μεταδίδουν ασθένειες όπως είναι ο ιός του Δυτικού Νείλου, ο ιός Usutu (Usutu virus - USUV), ο Ιός Tahyna (Tahyna virus - TAHV), ο ιός Sindbis (Sindbis virus - SINV), ο ιός της Ιαπωνικής Εγκεφαλίτιδας, ο κίτρινος πυρετός, ο πυρετός του ιού Rift Valley (Rift Valley fever virus - RVFV), ο δάγγειος πυρετός, ο κίτρινος πυρετός, η ελονοσία, ο chikungunya, η φιλαρίαση, (Anon, 2014; Caraballo & King, 2014) και ιός Ζίκα (Vogel, 2016) που αποτελούν σημαντική απειλή για τη δημόσια υγεία. Οι κύριοι διαβιβαστές για τον Ιό του Δυτικού Νείλου είναι τα κουνούπια του γένους *Culex* για τον ιό Ζίκα εκείνα του γένους *Aedes*, ενώ η ελονοσία μεταδίδεται με κουνούπια του γένους *Anopheles* (Public Health Ontario, 2015). Ο επιπολασμός αυτών των ασθενειών είναι υψηλότερος στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές και δυσανάλογα αυξημένος σε περιοχές που κατοικούν φτωχότεροι πληθυσμοί (WHO, 2020).

Μελετήθηκε στο εργαστήριο (25°C, 65 ± 5% Σ.Υ., 14:10 Φ:Σ) η βιοοικολογία πληθυσμών των σημαντικότερων κουνουπιών του συμπλέγματος του *Culex pipiens* (Linnaeus, 1758) και του *Aedes albopictus* (Skuse, 1895) (Diptera: Culicidae) που προέρχονταν από τη Θεσσαλία (δύο περιοχές από την πόλη της Λάρισας και μία από τον Βόλο). Σκοπός μας ήταν να παράξουμε πρωτογενή δεδομένα για τη βιοδημογραφία των σημαντικότερων κουνουπιών της Θεσσαλίας ώστε να υποστηρίξουμε μελλοντικά πληθυσμιακά μοντέλα που συμβάλουν στην καλύτερη οργάνωση της αντιμετώπισης των κουνουπιών και των ασθενειών που μεταδίδουν. Χρησιμοποιήθηκαν τα δύο υποείδη του *Cx. pipiens*, *Culex pipiens* f. *pipiens* και *Culex pipiens* f. *molestus* και το ασιατικό κουνούπι τίγρης *Aedes albopictus*. Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν έντομα F₁-F₆ γενεάς.

Στην πρώτη ενότητα πειραμάτων μελετήθηκε, η επίδραση του συνωστισμού και της ποσότητας τροφής στην επιβίωση και στη διάρκεια ανάπτυξης των ανήλικων σταδίων, καθώς και το μέγεθος και η μακροβιότητα των ενηλίκων του *Ae. albopictus* που προέκυπταν. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η αύξηση της ποσότητας της τροφής αύξησε την επιβίωση των προνυμφών για επίπεδα συνωστισμού 100, 300 προνύμφες / 1 lt ενώ τη μείωσε

ελαφρά για το επίπεδο συνωστισμού 600 προνύμφες /1 lt. Η επιβίωση των προνυμφών και στις δύο ποσότητες τροφής κορυφώθηκε στο ενδιάμεσο επίπεδο συνωστισμού (300 προνύμφες /1 lt). Η περίοδος ανάπτυξης των προνυμφών (χρόνος έως τη νύμφωση) μειωνόταν με την αύξηση του συνωστισμού και στα δύο επίπεδα τροφής, εκτός από το επίπεδο του υψηλότερου συνωστισμού και για τη μεγαλύτερη ποσότητα τροφής όπου αυξήθηκε ελαφρά. Η επιβίωση των νυμφών στη μεγαλύτερη ποσότητα τροφής ήταν μεγαλύτερη στο μικρότερο επίπεδο συνωστισμού και σχεδόν όμοια στα υπόλοιπα. Η περίοδος ανάπτυξης των νυμφών ήταν μακρύτερη στο υψηλότερο επίπεδο συνωστισμού ενώ παρουσίασε διαφορά στο μεσαίο επίπεδο συνωστισμού και στη μικρότερη ποσότητα τροφής. Η μακροβιότητα στα θηλυκά ήταν περίπου 30 ημέρες μακρύτερη από τα αρσενικά στο ίδιο επίπεδο συνωστισμού και στην ίδια ποσότητα τροφής. Στα θηλυκά για ποσότητα τροφής 1mg το μέγεθος των πτερύγων ήταν μικρότερο σε σχέση με την ποσότητα τροφής 2mg ανεξάρτητα από το επίπεδο συνωστισμού.

Στη δεύτερη ενότητα πειραμάτων μελετήθηκε η επίδραση της σύζευξης και των γευμάτων αίματος (ένα και πολλαπλά γεύματα αίματος) στη διάρκεια ζωής και στα δημογραφικά χαρακτηριστικά του *Ae. albopictus*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι α) η σύζευξη δεν επηρέασε τη διάρκεια ζωής ούτε των αρσενικών ούτε των θηλυκών του *Ae. albopictus*. Αντίθετα (β) ο αριθμός των γευμάτων αίματος μείωσε σημαντικά τη διάρκεια ζωής των θηλυκών. Τα δύο γεύματα αίματος μείωσαν κατά περίπου ένα μήνα τη διάρκεια ζωής των θηλυκών σε σχέση με τα συζευγμένα θηλυκά και κατά 20 ημέρες σε σχέση με εκείνα που έλαβαν ένα γεύμα αίματος. Όμως (γ) το δεύτερο γεύμα αίματος αύξησε την παραγωγή των ωών και των απογόνων των θηλυκών του *Ae. albopictus*. Συγκεκριμένα, το δεύτερο γεύμα αίματος διπλασίασε σχεδόν όλες τις παραμέτρους της αναπαραγωγής όπως είναι ο αριθμός των νυμφών ανά θηλυκό, το ποσοστό νύμφωσης των ωών και ο αριθμός των ενηλίκων απογόνων εκτός από την αναλογία φύλου που παρέμεινε σταθερή (1:1).

Στην τρίτη ενότητα πειραμάτων διεξήχθησαν πειράματα ποιοτικού ελέγχου σε άγρια και στείρωμένα αρσενικά του *Ae. albopictus*. Σε συνθήκες εργαστηρίου (28 ± 1 °C, 85 ± 5 % Σ.Υ., 14:10 Φ:Σ) αξιολογήθηκε για πληθυσμό του *Ae. albopictus* που προέρχονταν από την Ιταλία, το Μαυροβούνιο και από

την Ελλάδα η υπολειπόμενη μόλυνση του πληθυσμού με θηλυκά χωρίς να υπάρξει σημαντική στατιστική διαφορά στους διαφορετικούς πληθυσμούς.

Η ακτινοβολήση των αρσενικών είχε σημαντική επίδραση στη γονιμότητα των θηλυκών καθώς ήταν σημαντικά χαμηλότερη από την καταγεγραμμένη γονιμότητα του μάρτυρα. Επίσης μελετήθηκε και η επίδραση της μεταφοράς στην επιβίωση των στερωμένων αρσενικών με σημαντικά υψηλότερο ποσοστό θνησιμότητας στα αρσενικά κουνούπια που μεταφέρθηκαν, από τη μονάδα μαζικής εκτροφής στη Μπολόνια της Ιταλίας, στο Μαυροβούνιο σε σχέση με την Ελλάδα. Επίσης, μελετήθηκε σε συνθήκες εργαστηρίου (25 °C, 60% Σ.Υ και 14:10 Φ:Σ) για πληθυσμό του *Ae. albopictus* που προέρχονταν από την Βραυρώνα η επίδραση της πυκνότητας κατά τη μεταφορά από την Ιταλία στην Ελλάδα στην ικανότητα πτήσης των στερωμένων αρσενικών. Η αναλογία των αρσενικών που ξεκίνησαν να πετούν ήταν υψηλότερη στο μάρτυρα σε σύγκριση με τα στερωμένα, ανεξάρτητα από την πυκνότητα κατά τη μεταφορά. Επίσης, μελετήθηκε η επίδραση της σύζευξης, της τροφής και της έλλειψης νερού στην επιβίωση των αρσενικών μετά τη μεταφορά. Ανεξάρτητα από τη σύζευξη, η μακροβιότητα των άγριων αρσενικών δεν ήταν μεγαλύτερη από εκείνη των στερωμένων. Η σύζευξη δεν είχε εμφανή επίδραση στη μακροβιότητα των αρσενικών. Ομοίως, η αλληλεπίδραση μεταξύ της κατηγορίας του αρσενικού (άγριο, στερωμένο) και σύζευξης δεν ήταν σημαντική, υποδεικνύοντας ότι τα αποτελέσματα της σύζευξης ήταν παρόμοια στις δύο κατηγορίες αρσενικών. Η επιβίωση των άγριων και στερωμένων αρσενικών του *Ae. albopictus* υπό συνθήκες έλλειψης τροφής (μόνο νερό) ήταν παραπλήσια. Τα άγρια αρσενικά έζησαν περισσότερο από τα στερωμένα υπό έλλειψη τροφής και νερού.

Επιπλέον, μελετήθηκαν οι ημερήσιοι ρυθμοί της συχνότητας σύζευξης και διαπιστώθηκαν υψηλότερα ποσοστά σύζευξης αργά το απόγευμα και τις βραδινές ώρες. Τα άγρια αρσενικά συζευγνύονταν με υψηλότερους ρυθμούς νωρίς το πρωί και αργά το απόγευμα σε σύγκριση με τα στερωμένα ενώ οι αναλογίες σύζευξης ήταν παρόμοιες το μεσημέρι.

Από τα δεδομένα και των τριών χρονικών περιόδων, διαπιστώθηκε ότι τα άγρια αρσενικά συζευγνύονται με σχεδόν διπλάσια αναλογία σε σύγκριση με τα στερωμένα με πειραματική διάταξη χωρίς επιλογή σύζευξης. Η λανθάνουσα

περίοδος της πρώτης σύζευξης (χρόνος μέχρι την πρώτη σύζευξη) δεν διέφερε μεταξύ στερωμένων και άγριων αρσενικών. Ομοίως, η διάρκεια σύζευξης ήταν παρόμοια και στους δύο τύπους αρσενικών. Τα παρθένα θηλυκά συζευγνύονται σε υψηλότερα ποσοστά με άγρια αρσενικά σε σύγκριση με τα στερωμένα. Η λανθάνουσα περίοδος της πρώτης σύζευξης (χρόνος μέχρι την πρώτη σύζευξη) ήταν μικρότερη για τα στερωμένα αρσενικά σε σύγκριση με τα άγρια, ενώ η διάρκεια σύζευξης ήταν παρόμοια και για τους δύο τύπους αρσενικών.

Στην τέταρτη ενότητα πειραμάτων μελετήθηκε, η επίδραση της σύζευξης στη διάρκεια ζωής των βιοτύπων του *Cx. pipiens* (*Cx. pipiens* f. *pipiens* και *Cx. pipiens* f. *molestus*). Τα αρσενικά του *Cx. pipiens* f. *pipiens* είχαν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής ανεξάρτητα αν συζεύχθηκαν ή όχι σε σχέση με τα θηλυκά καθώς και μεγαλύτερο προσδόκιμο ζωής, ενώ στο *Cx. pipiens* f. *molestus* μεγαλύτερη διάρκεια ζωής είχαν τα παρθένα άτομα και των δύο φύλων. Εκτός από το φύλο, τη σύζευξη και την αλληλεπίδραση τους, ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας της επιβίωσης ήταν και ο βιότυπος. Συγκεκριμένα, (α) στο *Cx. pipiens* f. *pipiens* η διάρκεια ζωής των παρθένων αρσενικών ήταν περίπου 20 ημέρες μεγαλύτερη από τα αντίστοιχα θηλυκά ενώ στα συζευγμένα αρσενικά η διάρκεια ζωής ήταν περίπου ένα μήνα μεγαλύτερη σε σχέση με τα αντίστοιχα θηλυκά. Το προσδόκιμο ζωής (β) στο 50% της επιβίωσης στα παρθένα αρσενικά ήταν περίπου τρεις ημέρες μεγαλύτερο σε σχέση με τα θηλυκά ενώ στα συζευγμένα ήταν μία ημέρα μεγαλύτερο. Αντίθετα, (γ) στο *Cx. pipiens* f. *molestus* η σύζευξη στα αρσενικά μείωσε τη διάρκεια ζωής περίπου 20 ημέρες ενώ και στα θηλυκά η σύζευξη μείωσε την διάρκεια ζωής αλλά σε μικρότερο βαθμό. Η επιβίωση σε σχέση με την ηλικία κυμάνθηκε περίπου στα ίδια επίπεδα ανεξαρτήτου φύλου και σύζευξης, αλλά ήταν σαφώς μικρότερη σε σχέση με το *Culex pipiens* f. *pipiens*. Το μικρότερο προσδόκιμο ζωής μπορεί να σχετίζεται με την εξελικτική ιστορία του κάθε βιοτύπου (υπόγεια ή υπέργεια) και τον βαθμό προσαρμογής τους στις επικρατούσες κλιματολογικές συνθήκες.

Στην πέμπτη ενότητα πειραμάτων μελετήθηκε, η επίδραση του γεύματος αίματος στους βιότυπους του *Cx. pipiens* (*Cx. pipiens* f. *pipiens* και *Cx. pipiens* f. *molestus*). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι (α) η διάρκεια ζωής των θηλυκών του *Cx. pipiens* f. *pipiens* χωρίς γεύμα αίματος ήταν μακρύτερη περίπου δέκα ημέρες σε σχέση με ένα γεύμα αίματος. Το προσδόκιμο ζωής στο 50% της επιβίωσης με γεύμα αίματος ήταν τέσσερις ημέρες μικρότερο από το αντίστοιχο χωρίς γεύμα αίματος. Το γεύμα αίματος (γ) αύξησε την ωοπαραγωγή των θηλυκών του *Cx. pipiens* f. *pipiens* κατά περίπου 30 ωά ανά θηλυκό σε σχέση με εκείνη του *Cx. pipiens* f. *molestus* με αντίστοιχη επίδραση και στις παραγόμενες νύμφες και ενήλικους απογόνους. Στο *Cx. pipiens* f. *molestus* (δ) η ωοπαραγωγή χωρίς γεύμα αίματος ήταν αυξημένη κατά περίπου 15 ωά ανά θηλυκό σε σχέση με την ωοπαραγωγή με γεύμα αίματος με αντίστοιχη επίδραση και στις παραγόμενες νύμφες και ενήλικες απογόνους.

Με βάση τα δεδομένα από τα παραπάνω πειράματα εξάγονται συμπεράσματα σχετικά με τα δημογραφικά χαρακτηριστικά ελληνικών πληθυσμών κουνουπιών του γένους *Ae. albopictus* και των βιοτύπων του *Cx. pipiens* (*Cx. pipiens* f. *pipiens* και *Cx. pipiens* f. *molestus*). Αναλύεται η πρακτική εφαρμογή των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής σε πρακτικό και σε ερευνητικό επίπεδο.

SUMMARY

Mosquitoes (Diptera: Culicidae) transmit diseases such as West Nile virus, Usutu virus (USUV), Tahyna virus (TAHV), Sindbis virus (SINV), Japanese Encephalitis, yellow fever, Rift Valley fever virus (RVFV), dengue fever, yellow fever, malaria, chikungunya, filariasis, (Anon, 2014; Caraballo & King, 2014) and Zika virus (Vogel, 2016) that pose a significant threat to public health. The main transmitters for the West Nile Virus are the mosquitoes of the genus *Culex*, for Zika virus those of the genus *Aedes*, while malaria is transmitted by mosquitoes of the genus *Anopheles* (Public Health Ontario, 2015). The prevalence of these diseases is higher in tropical and subtropical regions and disproportionately higher regions where live poorer populations (WHO, 2020).

The bioecology of populations of the most important mosquitoes *Cx. pipiens* (Linnaeus, 1758) and *Ae. albopictus* (Skuse, 1895) (Diptera: Culicidae) was studied in the laboratory (25°C, 65 ± 5% RH, 14:10 L:D) originated from different areas of Thessaly (two areas from the city of Larissa and one from Volos). Our aim was to generate primary data on the biodemography of the most important mosquitoes of Thessaly in order to support future population models that contribute to the better organization of mosquito and mosquito-borne disease management. The two subspecies of *Cx. pipiens*, *Culex pipiens* f. *pipiens* and *Culex pipiens* f. *molestus* and the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*. In all experiments the insects used were at F1- F6 generations.

In the first set of experiments the impact of crowding and food quantity on the survival and duration of development of the juvenile stages were studied along with the size and longevity of the adult population of *Ae. albopictus*. The results of this chapter showed that generally the increasing food increased larval survival for a crowding level of 100, 300 larvae / 1 lt, while the survival slightly decreased for a crowding level of 600 larvae / 1 lt. Larval survival on both feed rates peaked at the intermediate stocking level (300 larvae/1 lt). Larval developmental period (time to pupation) decreased with increasing crowding at both food levels, except at the highest crowding level and for the highest food quantity where it increased slightly. Survival at the highest food

quantity was greatest at the lowest level of crowding and almost identical at the rest. The developmental period of the pupae was longer at the highest level of crowding, while it showed a difference at the middle level of crowding and at the lowest food quantity. Female longevity was about 30 days longer than males at the same crowding level and food quantity. In females for a food quantity of 1 mg the size of the wings were smaller compared to the food quantity of 2 mg and differed statistically regardless of the crowding levels.

In the second set of experiments the effect of mating and blood meals (single and multiple blood meals) on lifespan and demographic characteristics of *Ae. albopictus* were studied. The results of this chapter showed that a) mating did not affect the lifespan of *Ae. albopictus* males or females. In contrast, the number of blood meals significantly reduced the lifespan of females (b) two blood meals shortened the lifespan of females by a month compared to mated females and by 20 days compared to those that received one blood meal. The second blood meal increased the egg and offspring production of females of *Ae. albopictus*. Specifically, the second blood meal almost doubled all the parameters related to egg production such as the number of nymphs per female, the hatching rate of eggs and the number of adult offspring except the sex ratio remained constant (1:1).

In the third set of experiments, quality control experiments were performed on wild and sterilized males of *Ae. albopictus*. The experiments were conducted in laboratory conditions (28 ± 1 °C, 85 ± 5 % RH, 14:10 D:L) and the population of *Ae. albopictus* came from Italy, Montenegro and Greece. There was no statistical residual infection with females in the various populations.

Irradiation of males had a significant effect on fecundity of females as it was significantly lower than the recorded fecundity of the control. The effect of transportation on the survival of sterilized males was also studied with a significantly higher mortality rate in male mosquitoes transported to Montenegro compared to Greece. It was also studied in laboratory conditions (25 °C, 60% RH and 14:10 F:S) for a population of *Ae. albopictus* from Vravrona the effect of transport density on the flight ability of castrated males. The proportion of males that initiated flight was higher in the control compared to the neuters, regardless

of density, while no differences were found between the three transfer densities. Also, the effect of mating, food and water deprivation on male survival after transfer was studied. Regardless of mating, the longevity of wild males was not greater than that of castrated males, and mating had no apparent effect on male longevity. Likewise, the interaction between male type and mating was not significant, indicating that mating effects were similar across the two male types. In the response (time to death) of wild and castrated males of *Ae. albopictus* under food-deprived conditions (water only) both wild and neutered males had similar lifespans under food-deprived conditions but wild-type males lived longer than neutered ones under food and water deprivation.

In addition, diurnal rates of mating frequency were studied and higher mating rates were found in the late afternoon and evening hours. Wild males mated at higher rates in the early morning and late afternoon compared to neutered males while mating ratios were similar at midday. Wild males were found to mate at nearly twice the rate compared to neutered experimentally without mating selection. Latency to first copulation (time to first copulation) was not significantly longer for neutered males compared to wild ones. Similarly, mating duration was similar in both types of males. Virgin females mate at higher rates with wild males compared to spayed ones. First copulation latency (time to first copulation) was shorter for neutered males compared to wild-types, while mating duration was similar for both types of males.

In the fourth set of experiments the effect of mating on the lifespan of the biotypes of *Cx. pipiens* (*Cx. pipiens* f. *pipiens* and *Cx. pipiens* f. *molestus*) was studied. According to the findings *Cx. pipiens* f. *pipiens* males had a longer lifespan regardless of they were mated or not compared to females, as well as longer life expectancy, while both sexes of *Cx. pipiens* f. *molestus* had a longer lifespan in virgin individuals. In addition to sex, pairing and their interaction, population emerged as an independent survival predictor. Specifically, a) in *Culex pipiens* f. *pipiens* the life span of virgin males was about 20 days longer than the corresponding females while in mated males the life span was about one month longer than in the corresponding females b) the life expectancy at 50% of survival in virgin males was about three days longer than the females, while in the mated ones it was one day longer. Conversely, c) in *Cx. pipiens* f.

molestus, mating in males reduced the life span by about 20 days, while in females, mating also reduced the life span but to a lower extent.

In the fifth set of experiments the effect of the blood meal on lifespan and on demographic characteristics of the biotypes *Cx. pipiens* f. *pipiens* and *Cx. pipiens* f. *molestus* was studied. The results showed that a) the lifespan of *Cx. pipiens* f. *pipiens* females without a blood meal was about ten days longer than that with a blood meal, as well as the life expectancy at 50% survival with a blood meal was four days shorter than the corresponding one without b) the lifespan of *Cx. pipiens* f. *molestus* females without a blood meal was about one day longer than that with a blood meal, but life expectancy at both 25% and 50% survival with a blood meal was nine and three days longer than that without a blood meal c) one blood meal at both 25% and 50% survival was about 20 and 14 days longer in *Cx. pipiens* f. *pipiens* in relation to *Cx. pipiens* f. *molestus*, but life expectancy was longer in *Cx. pipiens* f. *molestus* seven and four days respectively d) the blood meal increased oviposition of females of *Culex pipiens* f. *pipiens* by 30 eggs per female compared to that of *Cx. pipiens* f. *molestus* with a corresponding effect on the produced nymphs and adult offspring e) *Cx. pipiens* f. *molestus* oviposition without a blood meal was increased by approximately 15 eggs per female relative to oviposition with a blood meal with a corresponding effect on both pupae and adult offspring produced.

Based on the data from the above experiments, conclusions are drawn regarding the demographic characteristics of Greek populations of mosquitoes of *Ae. albopictus* and the biotypes of *Cx. pipiens* (*Cx. pipiens* f. *pipiens* and *Cx. pipiens* f. *molestus*). The practical application of the results of this thesis is analyzed on practical and research level.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1 ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Κουνούπια και η σημασία τους στη δημόσια υγεία

Τα έντομα που τρέφονται με αίμα, όπως τα κουνούπια, επηρεάζουν την υγεία των ανθρώπων και των ζώων, καθώς μπορούν να μεταδώσουν μολυσματικές ασθένειες (Wilke et al., 2016). Αρκετές από τις ασθένειες που μεταδίδονται από τα κουνούπια, όπως η ελονοσία, ο ιός του Δυτικού Νείλου (Caraballo & King, 2014; Sanfelice, 2022), ο δάγκειος πυρετός (Martina et al., 2009; Sanfelice, 2022), ο ιός Zika (O'Donnell et al., 2017; Sanfelice, 2022), ο Chikungunya (Roth et al., 2014; Sanfelice, 2022) και ο κίτρινος πυρετός (Monath & Vasconcelos, 2015; Sanfelice, 2022). Σημαντικοί φορείς των παθογόνων που προκαλούν αυτές τις ασθένειες είναι τα κουνούπια που ανήκουν στα γένη *Aedes*, *Culex* και *Anopheles*, ευρέως διαδεδομένα στην Αφρική, την Ασία, τη Νότια Αμερική και την Ευρώπη (Kraemer et al., 2015; Sinka et al., 2012). Περίπου επτακόσια εκατομμύρια άνθρωποι σε όλο τον κόσμο υποφέρουν από ασθένειες που μεταδίδονται από τα κουνούπια, με αποτέλεσμα πάνω από ένα εκατομμύριο θανάτους (Piovezan-Borges et al., 2022).

Ο ακριβής προσδιορισμός των ειδών των κουνουπιών που υπάρχουν σε μία περιοχή είναι μεγάλης σημασίας για την κατανόηση των επιδημιολογικών προτύπων μετάδοσης της νόσου που μεταδίδουν. Ειδικότερα, οι αλληλεπίδραση μεταξύ του πληθυσμού των κουνουπιών μίας περιοχής, της αφθονίας ξενιστών, της φυσιολογικής κατάστασης του διαβιβαστή και των περιβαλλοντικών συνθηκών επηρεάζουν τη μετάδοση της νόσου. Όσο μεγαλύτερη είναι η αστικοποίηση (Kolimenakis et al., 2021) σε μια περιοχή, τόσο μειώνεται η ποικιλομορφία των κουνουπιών και τόσο μεγαλύτερη είναι η αφθονία μερικών, επιδημιολογικά σημαντικών ειδών που είναι καλά προσαρμοσμένα στα αστικά περιβάλλοντα (Ceretti-Júnior et al., 2015; Chaves et al., 2010; Medeiros-Sousa et al., 2013). Η επέκταση της γεωγραφικής

κατανομής των κουνουπιών ακολουθείται από την (επανεμφάνιση) ασθενειών, καθιστώντας απαραίτητο τον εντοπισμό επιδημιολογικά σημαντικών ειδών κουνουπιών (Cartaxo et al., 2011; Chaves et al., 2012; Consoli et al., 1994; Dibo et al., 2011; Do et al., 2014; Honório et al., 2009, Restrepo et al., 2014; Sang et al., 2014; Tipayamongkhogul et al., 2009; WHO, 2010; 2018; 2014; 2015).

Παρά τις έντονες προσπάθειες διεθνώς για τον έλεγχο των πληθυσμών κουνουπιών που μεταδίδουν ασθένειες καθώς και για περιορισμό αυτών, οι επιδημικές εστίες ασθενειών που μεταδίδονται από τα κουνούπια εξακολουθούν να είναι συχνές, ειδικά στις αναπτυσσόμενες χώρες. Τα εμβόλια σε αρκετές περιπτώσεις δεν είναι διαθέσιμα και η αποτελεσματικότητά τους πολλές φορές είναι περιορισμένη (Long & Zavala, 2016; Mendis et al., 1990).

1.1.1 Ταξινόμηση

Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες προσεγγίσεις για την αναγνώριση και την ταξινόμηση των κουνουπιών, όπως είναι η κυτταρογενετική, η ηλεκτροφόρηση και άλλες μοριακές μέθοδοι που περιλαμβάνουν μικροδορυφόρους, δείκτες, τυχαία ενισχυμένο πολυμορφικό δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και ενίσχυση ριβοσωμικού δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (Walton et al., 1999).

Όμως, η πιο κοινή μέθοδος αναγνώρισης κουνουπιών βασίζεται στη χρήση ταξινομικής κλειδας με μορφολογικούς χαρακτήρες (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Eritja et al., 2019; Harbach & Kitching 1998; Reinert, 2009; Rueda, 2004). Αξιόπιστο εργαλείο (Becker, 2020) για τη διάκριση μορφολογικά παρόμοιων ειδών έχει αποδειχτεί πως είναι και η γεωμετρική μορφομετρία που αναλύει τις πτέρυγες των κουνουπιών (Lorentz et al., 2012; Morais et al., 2010).

Αν η επιφάνεια της Γης χωριστεί σε βιογεωγραφικά βασίλεια με κριτήριο φυσικά εμπόδια που εμποδίζουν φυτά και ζώα να απομακρυνθούν από μία συγκεκριμένη περιοχή η μεγαλύτερη ποικιλομορφία σε είδη κουνουπιών παρουσιάζεται στη Νεοτροπική περιοχή, δηλαδή στην τροπική και εύκρατη νότια Αμερική (Χιλή, Βραζιλία, Μεξικό, Αντίλες) με το 31% να αφορά γνωστά είδη. Ακολουθεί η Ανατολική περιοχή (κεντρική Ινδία, Σρι Λάνκα, Ινδοκίνα,

Βορειοανατολική Ασία) με ποικιλομορφία που φτάνει στο 30%, η Αφροτροπική (ανατολική, δυτική και νότια Αφρική, Μαφαγασκάρη) και η Αυστραλιανή περιοχή (Αυστρο-Μαλαισία, Αυστραλία, Πολυνησία, Νέα Ζηλανδία) με ποικιλομορφία που φτάνει το 22% αντίστοιχα. Αντίθετα, η Νεαρκτική περιοχή συμπεριλαμβανομένων των Ηνωμένων Πολιτειών και του Καναδά, έχει τη χαμηλότερη ποικιλότητα ειδών με μόλις 5% (Rueda, 2008).

Σχετικά με την ταξινόμηση των κουνουπιών αυτά ανήκουν στα έντομα, στην τάξη των διπτέρων, στην υποτάξη Νηματόκερα, στην οικογένεια Culicidae και έχουν τρεις αναγνωρισμένες υποοικογένειες τα Anophelinae, τα Culicinae και τα Toxorhynchitinae (Azari-Hamidian et al., 2019) (Πίνακας 1). Υπάρχουν περίπου 3500 καταγεγραμμένα είδη κουνουπιών παγκοσμίως (Harbach, 2007) με 41 γένη και 188 υπογένη (WRBU, 2018). Η υποοικογένεια Toxorhynchitinae περιλαμβάνει μόνο το γένος *Toxorhynchites*, η υποοικογένεια Anophelinae περιλαμβάνει τα γένη *Anopheles* και *Chagasia* ενώ η υποοικογένεια Culicinae περιλαμβάνει όλα τα υπόλοιπα γένη *Aedes*, *Culex*, *Culiseta*, *Mansonia*, *Coquillettidia*, *Uranotaenia* κ.α.

Το γένος *Aedes* έχει τον μεγαλύτερο αριθμό ειδών, με 33 είδη μη συγκεκριμένου υποείδους και 900 είδη ταξινομημένα σε 72 υποείδη. Ακολουθεί το γένος *Culex* με 763 είδη σε 26 υποείδη, ενώ το γένος *Anopheles* έχει περίπου 460 είδη και 7 υποείδη (Harbach, 2013; Samanidou – Voyadjoglou & Darsie, 1993; Wilkerson et al., 2015). Στην Ελλάδα, τα κουνούπια που ανήκουν στην υποοικογένεια Culicinae ονομάζονται «κοινά» ενώ εκείνα της υποοικογένειας Anophelinae «ανωφελή».

Ταξινόμηση κουνουπιών

Πίνακας 1.1 Ταξινόμηση κουνουπιών στις σημαντικότερες κατηγορίες

Βασίλειο	Animalia
Συνομοταξία	Arthropoda
Ομοταξία	Insecta
Τάξη	Diptera
Υποτάξη	Nematocera
Οικογένεια	Culicidae
Υποοικογένεια	Anophelinae
	Culicinae
	Toxorhynchitinae
Γένος	<i>Anopheles</i>
	<i>Culex</i>
	<i>Aedes</i>

1.1.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά των κουνουπιών

Ενήλικα

Ο διαχωρισμός των κουνουπιών από άλλα έντομα και δίπτερα της τάξης Νηματόκερα (Nematocera) γίνεται από τα εξής χαρακτηριστικά: α) τρίχες και λέπια καλύπτουν όλα τα μέρη του σώματος (κεφάλι, θώρακας, κοιλία) – χαρακτηριστικό της οικογένειας Culicidae (Βογιατζόγλου - Σαμανίδου, 2011), β) η καλά αναπτυγμένη προβοσκίδα που προεξέχει (Service, 2012). Τα ενήλικα κουνούπια έχουν μέγεθος 3-6 mm και πλάτος 2-9 mm.

Ανάμεσα από το άνω (labrum) και κάτω (labium) χείλος υπάρχει ζεύγος άνω γνάθων, ο υποφάρυγγας, δύο προσακτρίδες και ανάμεσα η προβοσκίδα που προεξέχει και αποτελεί τα στοματικά μόρια που είναι νύσσων – αίματος μυζητικού τύπου (Σαββοπούλου – Σουλτάνη & συνεργάτες, 2011).

Το κεφάλι έχει σχήμα ωοειδές με δύο μεγάλους σύνθετους οφθαλμούς και με δύο κεραίες που είναι πτεροειδείς (plumose) για τα αρσενικά και νηματοειδείς για τα θηλυκά (pilose) (Εικόνα 1.1).



(A)

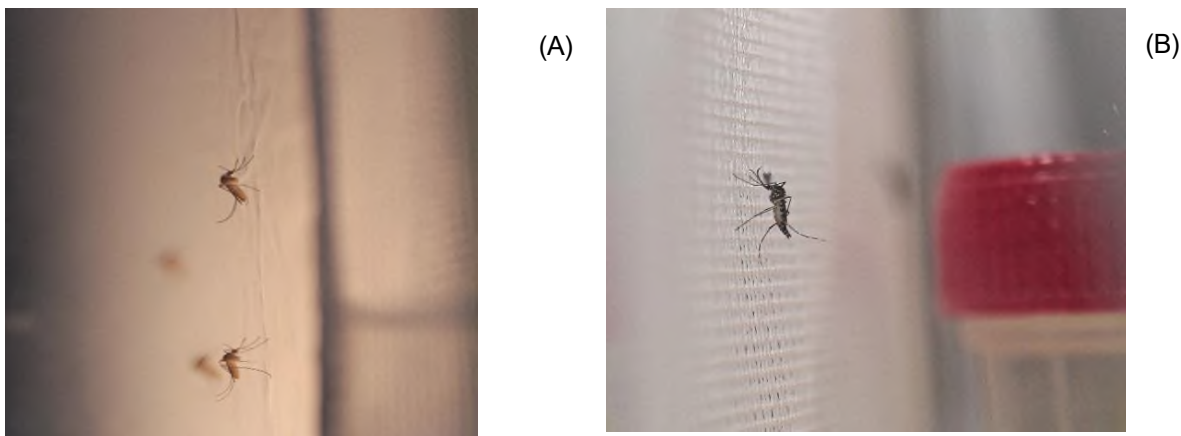


(B)

Εικόνα 1.1 Αρσενικά (A) και θηλυκά (B) ενήλικα κουνούπια

Στις κεραίες βρίσκεται το όργανο Johnston's που αποτελεί όργανο ακοής στα αρσενικά κουνούπια. Οι γναθικές προσακτρίδες στα Culicinae είναι ίδιου μεγέθους με την προβοσκίδα ενώ στα θηλυκά είναι κοντύτερες, ενώ στα Anophelinae έχουν το ίδιο μήκος με την προβοσκίδα. Τα ενήλικα του γένους *Toxorhynchites* έχουν μεγάλη και κυρτή προβοσκίδα και δεν είναι αιμομυζητικά, αλλά αρπακτικά (Steffan, 1975).

Κάθε τμήμα του θώρακα φέρει ένα ζεύγος ενωμένων ποδιών, με τον μεσοθώρακα να φέρει ένα ζεύγος λειτουργικών πτερύγων που είναι λεπτές και διαφανείς και φέρουν ένα απλό νεύρο ανάμεσα από δύο διακλαδισμένα ενώ ο μεταθώρακας φέρει ένα ζεύγος αλτήρων (τροποποιημένο 2^ο ζεύγος πτερύγων). Η κοιλία έχει 10 τμήματα, εκ των οποίων τα τρία τερματικά τμήματα είναι εξειδικευμένα για αναπαραγωγή και απέκκριση (Βογιατζόγλου – Σαμανίδου, 2011). Στα Culicinae η κοιλία καλύπτεται κατά βάση κυρίως με καφέ φολίδες για το *Culex* sp. (Εικόνα 1.2) μαύρες ή υπόλευκες για το *Aedes* sp. (Εικόνα 1.2) ενώ τα Anophelinae χαρακτηρίζονται από την απουσία φολίδων.



Εικόνα 1.2 Ενήλικα κουνούπια του γένους (A) *Culex* sp., (B) *Aedes* sp.,

Στο τελευταίο κοιλιακό τμήμα ενός θηλυκού κουνουπιού υπάρχει ένα ζεύγος εξαρτημάτων που ονομάζονται κέρκοι, ενώ στο αρσενικό κουνούπι οι προέχοντες σφιγκτήρες αποτελούν μέρος των εξωτερικών γεννητικών οργάνων.

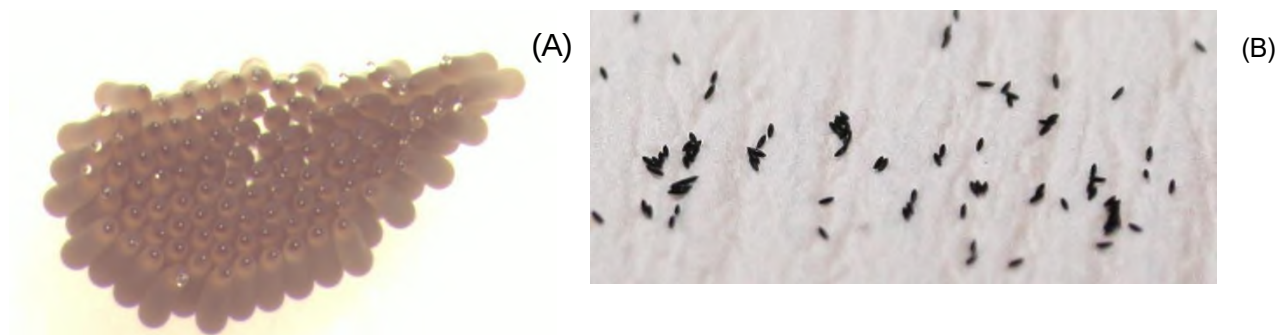
Στα Culicinae ο θυρεός που βρίσκεται στο άκρο του μεταθώρακα και αποτελεί διαγνωστικής σημασίας ανατομικό χαρακτηριστικό είναι τρίλοβος με σμήρριγγες μόνο στους λοβούς ενώ στα Anophelinae ο θυρεός είναι στρογγυλεμένος και φέρει σμήρριγγες σε όλη την περίμετρο. Τα Culicinae αναπαύονται παράλληλα με το υπόστρωμα ενώ τα Anophelinae σχηματίζουν γωνία όταν αναπαύονται.

Ωά

Τα ωά είναι μικρά, επιμήκη και κατά την απόθεση είναι μαλακά και υπόλευκα ή ανοιχτόχρωμα ενώ με την πάροδο του χρόνου γίνονται τεφρά και μελανά (Βογιατζόγλου – Σαμανίδου, 2011). Ο αριθμός των ωών κυμαίνεται από 40 – 500 ανά θηλυκό κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Τα θηλυκά έχουν τη δυνατότητα να ωοτοκήσουν έως και 6 φορές κατά τη διάρκεια της ζωής τους.

Στα Culicinae, όπως και στο γένος *Culex*, *Mansonia* και *Coquillettidia* τα ωά (Εικόνα 1.3A) προσκολλώνται μεταξύ τους κατά την εναπόθεση και σχηματίζουν ένα είδος σχεδίας, ενώ στα γένη *Aedes* και *Ochlerotatus* αποτίθενται μεμονωμένα (Εικόνα 1.3B). Μεμονωμένα αποτίθενται και τα ωά των περισσότερων γενών Anophelinae, με χαρακτηριστικούς πλωτήρες που

εξασφαλίζουν την επίπλευσή τους. Ο τρόπος που αποτίθενται τα ωά καθώς και τα χαρακτηριστικά τους αποτελούν διαγνωστικούς χαρακτήρες μεταξύ των γενών.



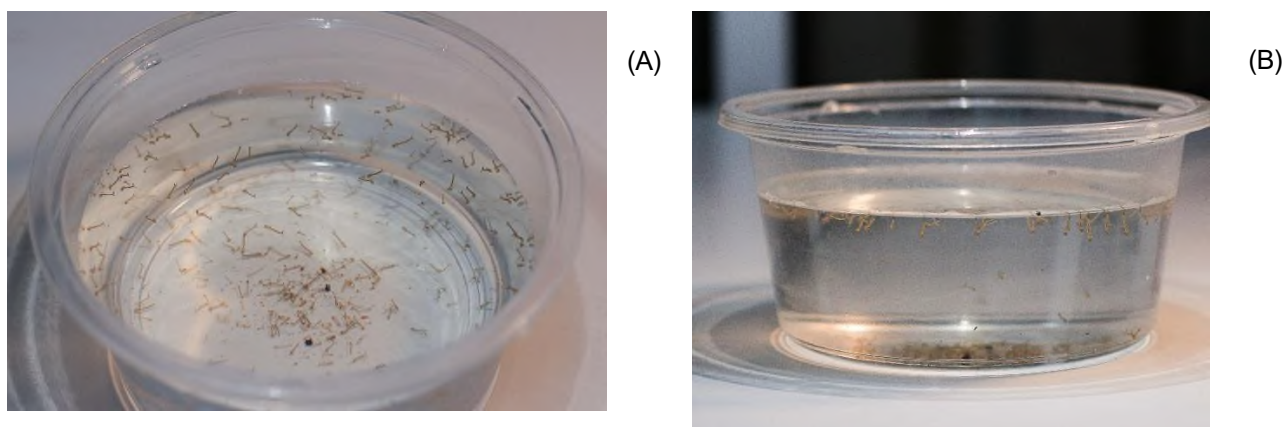
Εικόνα 1.3 Ωά κουνουπιών του γένους (A) *Culex* σε σχεδία και του (B) *Aedes* μεμονωμένα.

Προνύμφες

Σε αντίθεση με το ενήλικο, η προνύμφη αποτελείται κυρίως από μαλακούς, μεμβρανώδεις ιστούς στο θώρακα και την κοιλία και σκληρωτινισμένες πλάκες στο κεφάλι (Rueda, 2008) (Εικόνα 1.4). Οι προνύμφες κινούνται στο νερό, είναι άποδες με αναπτυγμένη κεφαλή, σύνθετους οφθαλμούς, ζεύγος κεραιών μασητικού τύπου στοματικά μόρια. Ο θώρακας είναι στρογγυλός και μαζί με την κοιλιά αποτελείται από δέκα τμήματα. Στις υποοικογένειες Toxorhynchitinae και Culicinae το αναπνευστικό σύστημα καταλήγει σε σιφώνιο – siphon στο 8^ο κοιλιακό τμήμα και κατά την αναπνοή σχηματίζει γωνία με την επιφάνεια του νερού για τη λήψη οξυγόνου. Εξάιρεση αποτελούν τα γένη *Mansonia* και *Coquillettidia* με τις προνύμφες να παραμένουν προσκολλημένες στις ρίζες υδρόβιων φυτών και να αναπνέουν παραμένοντας συνεχώς μέσα στο νερό αφού βυθίζουν το κατάλληλα διαμορφωμένο σιφώνιό τους στους αεραγωγούς του ριζικού συστήματος των φυτών. Αντίθετα οι προνύμφες των Anophelinae δεν διαθέτουν σιφώνιο αλλά

αναπνέουν με ζεύγος αναπνευστικών τμημάτων που υπάρχει στο 8^ο κοιλιακό άρθρο και παραμένουν σε παράλληλη θέση με την επιφάνεια του νερού (Σαββαπούλου – Σουλτάνη και συνεργάτες, 2011).

Οι προνύμφες του γένους *Toxorhynchites* έχουν σκούρο χρώμα έως κοκκινωπό, έχουν μεγάλο μέγεθος και τρέφονται με προνύμφες άλλων κουνουπιών (Steffan, 1975). Ομοίως οι προνύμφες του γένους *Aedes* είναι σκουρόχρωμες σε σχέση με εκείνες του *Culex*.



Εικόνα 1.4 Προνύμφες κουνουπιών του γένους *Culex* (A) και *Aedes* (B)

Νύμφες

Οι νύμφες των κουνουπιών δεν τρέφονται και ούτε μεταβάλλονται σε μέγεθος, είναι ακίνητες στην επιφάνεια του νερού και βυθίζονται όταν αυτό διαταραχθεί (Εικόνα 1. 5).

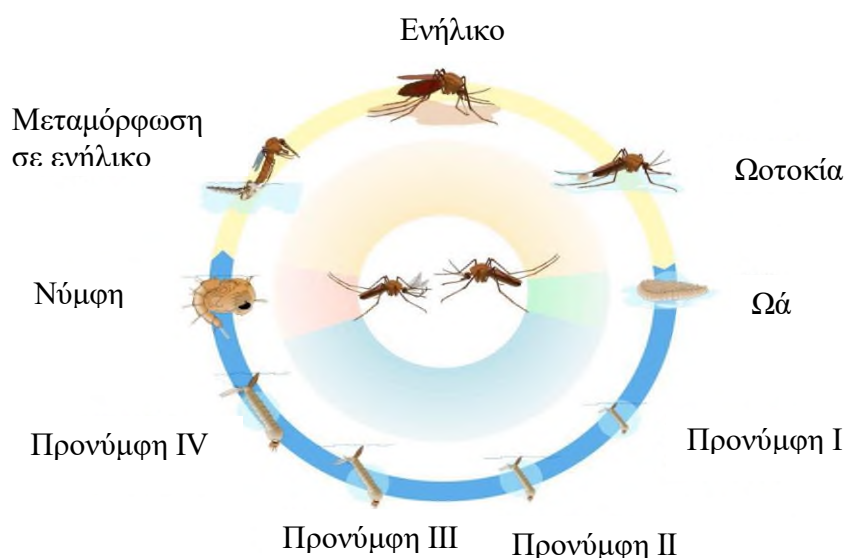


Εικόνα 1.5 Νύμφες κουνουπιού του γένους *Culex* και *Aedes*

Η αναπνοή των νυμφών γίνεται από ραχιαίες αναπνευστικές διόδους στον κεφαλοθώρακα και έχουν χοανοειδές σχήμα (trumpets). Τα είδη *Mansonia* και *Coquillettidia* ανεβαίνουν σπάνια στην επιφάνεια του νερού αφού λαμβάνουν οξυγόνο από την υδρόβια βλάστηση με τροποποιήσεις στις αναπνευστικές σάλπιγγες. Η διάρκεια του νυφικού σταδίου εξαρτάται από το είδος του κουνουπιού και από τη θερμοκρασία του νερού. Στις τροπικές περιοχές είναι 2-3 ημέρες, ενώ σε ψυχρότερες εύκρατες 9-12 ή και περισσότερες ημέρες. Η έξοδος του ενήλικου γίνεται με το πέρας του νυφικού σταδίου, αφού σχίζεται το δερμάτιο στη ραχιαία επιφάνεια του κεφαλοθώρακα και εξέρχεται το ενήλικο που στηρίζεται στο έκδημα της νύμφης που επιπλέει. Ο εξωσκελετός του είναι μαλακός και χρειάζονται περίπου 10-15 λεπτά για να σκληρωτινηθεί ώστε το έντομο να είναι ικανό για πτήση (Βογιατζόγλου – Σαμανίδου, 2011).

1.1.3 Βιολογικός κύκλος και βιολογία

Ο βιολογικός κύκλος των κουνουπιών αποτελείται από 4 στάδια: το ωό, την προνύμφη, τη νύμφη και το ενήλικο. Το ωό εκκολάπτεται στο νερό και οι υδρόβιες προνύμφες μετά τις τέσσερις προνυμφικές ηλικίες (instars), νυμφώνονται και γίνονται ενήλικα (Βογιατζόγλου – Σαμανίδου, 2011).



Εικόνα 1.6 Ο βιολογικός κύκλος των κουνουπιών (τροποποιημένο <https://el.wikipedia.org>)

Μετά την έξοδο από το νυμφικό περίβλημα και αφού παρέλθει χρονικό διάστημα 2-9 ημέρες, το ενήλικο θηλυκό καθίσταται ώριμο αναπαραγωγικά και συζευγνύεται, λαμβάνοντας ποσότητα σπερματοζωαρίων ικανή για γονιμοποίηση ωών για όλη τη διάρκεια της ζωής του. Αντιθέτως, το αρσενικό συζευγνύεται πολλές φορές στην διάρκεια της ζωής του.

Μετά τη γονιμοποίηση το θηλυκό αναζητά ξενιστή για να λάβει γεύμα αίματος και να εξασφαλίσει τις απαραίτητες πρωτεΐνες ώστε να ολοκληρωθεί η ωογένεση (Βογιατζόγλου – Σαμανίδου, 2011). Τα θηλυκά κουνούπια προκειμένου να λάβουν γεύμα αίματος, χρησιμοποιούν οπτικά, θερμικά και οσφρητικά ερεθίσματα για να εντοπίσουν τους ξενιστές. Τα οσφρητικά ερεθίσματα είναι σημαντικά καθώς το κουνούπι πλησιάζει τον ξενιστή, ενώ τα οπτικά ερεθίσματα φαίνονται σημαντικά για τον προσανατολισμό κατά την πτήση (Rueda, 2008).

Το γεύμα αίματος των θηλυκών προέρχεται από ανθρώπους, ζώα και άλλα σπονδυλωτά και η προτίμηση εξαρτάται από το είδος του κουνουπιού, δηλαδή αν είναι ανθρωπόφιλο, ζωόφιλο ή παρουσιάζει και ενδιαμέση προτίμηση όπως το γένος *Culex* sp. Μερικά είδη κουνουπιών τρέφονται κατά τη διάρκεια της ημέρας (*Aedes* sp.), ενώ άλλα προτιμούν να τρέφονται το σούρουπο και τη νύχτα (*Culex* sp., *Anopheles* sp.).

Ορισμένα είδη παρουσιάζουν εποχιακή εναλλαγή ξενιστών που έχει ως αποτέλεσμα τη μετάδοση ασθενειών από τα ζώα στον άνθρωπο (ή τη μετάδοση ζωονοσογόνων νόσων). Ορισμένα θηλυκά μπορούν επίσης να παράγουν βιώσιμα ωά (*Culex pipiens* f. *molestus*), ακόμη και χωρίς γεύμα αίματος (αυτογενή θηλυκά). Τα θηλυκά των αρπακτικών (*Toxorhynchites*) και άλλων κουνουπιών δεν τρέφονται με αίμα (Rueda, 2008).

Το γονιμοποιημένο θηλυκό εξετάζει την καταλληλότητα της εστίας αναπαραγωγής για την ανάπτυξη των απογόνων του. Τα γένη των κουνουπιών που εναποθέτουν σχεδίες ωών (*Culex*, *Culiseta*) σε κάθε ωό αφήνουν μικροσταγονίδιο φερομόνης (φερομόνη ωοθεσίας – oviposition pheromone) που λειτουργεί ως φερομόνη συνάθροισης (Mihou & Michaelakis, 2010) και ελκύει περισσότερα θηλυκά να ωοτοκήσουν στην ίδια εστία (Clements, 1999).

Το ενήλικο θηλυκό ωτοκεί είτε μεμονωμένα (*Aedes* και *Anopheles*) κατά μήκος των περιθωρίων λιμνών και ρεμάτων νερού, στους τοίχους τεχνητών εμπορευματοκιβωτίων ή σε υγρό περιβάλλον που υπόκειται σε πλημμύρες είτε σε ομάδες (*Culex* και *Culiseta*) έως και εκατοντάδες ωά κάθε φορά, στην επιφάνεια του νερού, στην επιφάνεια των πλωτών φυτών (Rueda, 2008). Το θηλυκό ωτοκεί 4-6 φορές κατά την διάρκεια της ζωής του 50 – 500 ωά και η εκκόλαψη αυτών γίνεται σε 2-3 ημέρες για τα τροπικά κλίματα ενώ σε ψυχρότερες εύκρατες περιοχές τα ωά εκκολάπτονται σε 7 – 14 ή και περισσότερες ημέρες.

Οι προνύμφες αποβάλλουν το δερμάτιό τους τέσσερις φορές πριν γίνουν νύμφες και στα περισσότερα είδη τρέφονται με οργανική ύλη και άλλους μικροοργανισμούς για 1-3 εβδομάδες, αν και αυτό εξαρτάται από παράγοντες όπως το είδος του κουνουπιού, η θερμοκρασία, η επάρκεια τροφής και η διαθεσιμότητα χώρου. Οι προνύμφες των αρπακτικών κουνουπιών (*Toxorhynchites*) τρέφονται με προνύμφες άλλων κουνουπιών. Σε ορισμένα αρπακτικά είδη πρώτα η προνύμφη λειτουργεί ως φίλτρο των μικροοργανισμών που βρίσκονται στο νερό, ενώ στο δεύτερο έως το τέταρτο στάδιο έχουν καλά ανεπτυγμένα στοματικά μόρια.

Τα ανήλικα στάδια των κουνουπιών βρίσκονται σε διαφορετικούς υδρόβιους βιότοπους, δηλαδή τάφρους, βάλτους, ρυάκια, λίμνες, έλη, προσωρινές και μόνιμες πισίνες εδάφους, τρύπες βράχων, τρύπες από δέντρα, τρύπες από καβούρια, περιθώρια λιμνών, τεχνητά δοχεία (τενεκέδες, ελαστικά, τροφοδότες πτηνών και βάζα λουλουδιών), φυσικά ή φυτικά δοχεία (φρούτα, φύλλα, φλοιοί, κόμβοι μπαμπού και τρύπες από δέντρα) και άλλα ενδιστοιχεία (Laird, 1998; Rueda et al., 2005; 2006; Rueda, 2008). Η γνώση των ενδιστοιχείων των προνυμφών κουνουπιών είναι απαραίτητη για το σχεδιασμό αποτελεσματικών προγραμμάτων καταπολέμησης και στρατηγικών πρόληψης ασθενειών. Σε αντίθεση με τις προνύμφες, οι νύμφες δεν τρέφονται και μπορούν να ζήσουν από 1 έως 3 ημέρες πριν ενηλικιωθούν.

1.1.4 Κουνούπια διαβιβαστές σημαντικών ασθενειών

Τα κουνούπια βρίσκονται στο κέντρο της παγκόσμιας εντομολογικής έρευνας ως διαβιβαστές εύρους παρασιτικών ασθενειών καθώς οι αιμομυζητικές συνήθειες των θηλυκών επηρεάζουν ανθρώπους και ζώα. Το 10% του πληθυσμού (700 εκατομμύρια) έχει μολυνθεί από μία ή και περισσότερες ασθένειες όπως κίτρινος πυρετός, ιός Usutu (Usutu virus - USUV), πυρετός του ιού Rift Valley (Rift Valley fever virus - RVFV), ιός της Ιαπωνικής Εγκεφαλίτιδας, ιός Tahyna (Tahyna virus - TAHV), ελονοσία, ιός Sindbis (Sindbis virus - SINV), ιός του Δυτικού Νείλου, δάγγειος πυρετός, κίτρινος πυρετός chikungunya, φιλαρίαση (Anon, 2014; Caraballo & King, 2014) και ιός Ζίκα (Vogels et al., 2016). Όπως αναφέρεται παραπάνω τα κουνούπια του γένους *Culex* μεταδίδουν τον Ιό του Δυτικού Νείλου, εκείνα του γένους *Aedes* τον Ιό Ζίκα και τον Δάγγειο ενώ η ελονοσία μεταδίδεται με το γένος *Anopheles* (Public Health Ontario, 2015).

Ιός του Δυτικού Νείλου (ΙΔΝ – West Nile Virus - WNV)

Ο ιός του Δυτικού Νείλου ανήκει στα ιογενή παθογόνα της οικογένειας Flaviviridae (Φλαβοϊοί) που προκαλούν εγκεφαλίτιδες με πυρετό (Lindenbach, 2001). Απομονώθηκε το 1937 στην Ουγκάντα (Smithburn et al., 1940) και ενδημεί σε Αφρική, Ευρώπη, Μέση Ανατολή, Βόρεια Αμερική και Δυτική Ασία. Στην Ευρώπη, έχουν καταγραφεί κρούσματα σε Τσεχία, Πορτογαλία, Ρουμανία, Ρωσία (Pages et al., 2009), Ισπανία (Engler et al., 2016), Κροατία, Ελλάδα, Ιταλία και Σερβία (Papa et al., 2013; Vilibic-Cavlek et al., 2019). Εργαστηριακά πειράματα έδειξαν πως οι ευρωπαϊκοί πληθυσμοί του *Cx. pipiens*, οι βιότυποι *Cx. pipiens* f. *pipiens* και *Cx. pipiens* f. *molestus* μεταδίδουν τον ΙΔΝ (Martinet et al., 2019). Το *Cx. pipiens* είναι ενισχυτικός διαβιβαστής στον ενζωτικό κύκλο (από πουλιά σε πουλιά), ως φορέας γέφυρα στον ενζωτικό κύκλο (από τα πουλιά στα θηλαστικά) αλλά και ως αποθήκη (Balenghien et al. 2008; Calzolari et al. 2015; Farajollahi et al. 2011; Rudolf et al. 2017; Savage et al. 1999). Ο βιότυπος *Cx. pipiens* f. *pipiens* τρέφεται κυρίως σε πουλιά, ενώ ο βιότυπος *Cx. pipiens* f. *molestus* και τα υβρίδια που τρέφονται με πουλιά και θηλαστικά διαδραματίζοντας σημαίνων ρόλο φορέων γέφυρων στον επιζωτικό κύκλο

(Vogels et al., 2017).

Ο ΙΔΝ εγκαταστάθηκε στην χώρα μας από το 2010 έως το 2014 και από το 2017 έως το 2019 σχεδόν σε όλες τις Περιφέρειες της χώρας. Αρκετά είδη κουνουπιών μεταδίδουν τον ΙΔΝ με κύριο φορέα είδη του γένους *Culex* (Kilpatrick et al., 2005) όπως *Cx. pipiens*, *Culex quinquefasciatus*, *Culex stigmatosoma*, *Culex thriambus* και *Culex nigripalpus*, ενώ πάνω από 65 άλλα είδη έχουν βρεθεί θετικά στον ιό (Reisen et al., 2006). Ο άνθρωπος, τα ιπποειδή και άλλα θηλαστικά αποτελούν «αδιέξοδο τελικό ξενιστή» - (dead-end host) (Bowen & Nemeth, 2007). Ο ΙΔΝ προσβάλλει το νευρικό σύστημα με συμπτώματα όπως πονοκέφαλος, υψηλός πυρετός, σωματικός πόνος, κόπωση, εμετός, ναυτία, πρησμένοι λεμφαδένες, δερματικός ερεθισμός, μυϊκή αδυναμία, τρέμουλο, αποπροσανατολισμός, ακαμψία στον αυχένα, παράλυση και κόμμα με την διάγνωση να γίνεται με PCR (WHO, 2017).

Φιλαριάσεις

Οι φιλαριάσεις οφείλονται σε νηματώδεις σκώληκες που μεταδίδονται σε αστικές και ημιαστικές περιοχές από είδη *Culex*, σε νησιά του Ειρηνικού από είδη *Aedes* και σε αγροτικές περιοχές και στην Αφρική από είδη *Anopheles*. Ο άνθρωπος μολύνεται από φιλαριάσεις και διακρίνονται σε δύο μορφές: στη λυμφατική και στη διροφυλαρίαση. Από το 1995 τα ανθρώπινα κρούσματα στην Ευρώπη και ιδιαίτερα στην Ιταλία αυξήθηκαν (Pampriglione et al., 1995). Αν και ο άνθρωπος δεν αποτελεί φυσικό ξενιστή, ο νηματώδης σκώληκας περνά στον οργανισμό μέσω του γεύματος αίματος των κουνουπιών και προκαλεί πνευμονικά και υποδόρια οζίδια. Η θεραπεία περιλαμβάνει αφαίρεση των δερματικών οζιδίων και των πνευμονικών προσβολών (CDC, 2020).

Ιός Ζίκα

Ο ιός Ζίκα είναι φλαβοϊός και διαπιστώθηκε στην Ουγκάντα το 1947 και το 1952. Κρούσματα αναφέρθηκαν σε Αφρική, ΗΠΑ, Ασία και στον Ειρηνικό. Η πρώτη έξαρση του ιού αναφέρθηκε στο νησί Yap το 2007 και ακολούθησε η Γαλλική Πολυνησία το 2013 και άλλες χώρες του Ειρηνικού. Τον Ιούλιο του 2015 συνδέθηκε με το σύνδρομο Guillain-Barré και τον Οκτώβριο με την μικροεγκεφαλίτιδα (ECDC, 2018).

Ο ιός Ζίκα μεταδίδεται από κουνούπια του γένους *Aedes* και τα συμπτώματα είναι πυρετός, εξανθήματα, πόνους στους μύες και στις αρθρώσεις, δυσφορία και πονοκέφαλος που διαρκούν 2-7 ημέρες. Στην εγκυμοσύνη προκαλείται στα νεογέννητα μικροεγκεφαλίτιδα και δυσμορφίες καθώς και πρόωρη γέννα ή και αποβολή. Αυξημένος είναι ο κίνδυνος για νευρολογικές επιπλοκές σε παιδιά και ενήλικες, συμπεριλαμβανομένου το σύνδρομο Guillain-Barré, νευροπάθειες και μυελίτιδα (WHO, 2022).

Το 2019 εμφανίστηκε στην Ευρώπη η πρώτη αυτόχθονη περίπτωση του ιού Ζίκα (WHO, 2022). Δεκαεννέα χώρες στην Ευρώπη και σε γειτονικές περιοχές χαρακτηρίζονται από μέτρια πιθανότητα μετάδοσης (από την υψηλότερη στη χαμηλότερη) και αυτές είναι οι εξής: Γαλλία, Ιταλία, Μάλτα, Κροατία, Ισραήλ, Ισπανία, Μονακό, Σαν Μαρίνο, Τουρκία, Ελλάδα, Ελβετία, Βουλγαρία, Ρουμανία, Σλοβενία, Γεωργία, Αλβανία, Βοσνία Ερζεγοβίνη και Μαυροβούνιο. Το 2015 – 2016 υπήρξε έξαρση της νόσου στη νότια Αμερική (Hajra et al., 2016).

Ελονοσία

Η ελονοσία (malaria) προκαλείται από πρωτόζωα του γένους *Plasmodium* με τα γνωστά είδη πλασμοδίων που προσβάλλουν τον άνθρωπο να είναι τα: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* και *Plasmodium knowlesi*. Η εξάπλωση της ελονοσίας περιλαμβάνει 107 περιοχές/χώρες (WHO, 2013) με τις 97 να έχουν συνεχιζόμενη μετάδοση. Η ελονοσία ενδημεί στην υποχασάρια Αφρική και σε αρκετές χώρες της Ασίας. Σε παγκόσμιο επίπεδο το 2018 τα κρούσματα ελονοσίας ανήλθαν στα 228 εκατομμύρια με το 93% να βρίσκεται στην Αφρική ενώ οι θάνατοι έφτασαν τις 405.000 με το 67% εξ' αυτών να αφορά παιδιά μικρότερα των 5 ετών. Η θεραπεία γίνεται με την χρήση ανθελονοσιακών φαρμάκων. Τα συμπτώματα είναι το έντονο παροξυσμικό ρίγος, ο υψηλός πυρετός, η εφίδρωση, η αδιαθεσία, η κεφαλαλγία και οι μυαλγίες (WHO, 2016).

Στην Ελλάδα, η ελονοσία εκριζώθηκε το 1974 με εντατικό πρόγραμμα καταπολέμησης (1946-1960) ενώ μέχρι το 2008 τα κρούσματα ανέρχονταν στα 20-50 το έτος από εισαγόμενες περιπτώσεις. Την περίοδο 2009 και 2010

καταγράφηκαν περιστατικά ελονοσίας *P. vivax* τοπικά στη Νότια Ελλάδα, στον Ευρώτα Λακωνίας στην Πελοπόννησο (HCDCP, 2015). Επίσης την περίοδο 2011-2012 εντοπίστηκαν συνολικά 84 κρούσματα ελονοσίας, τόσο σε Έλληνες (46 κρούσματα) όσο και σε μετανάστες (38 κρούσματα), γεγονός που είχε ως αποτέλεσμα να αναπτυχθούν μέτρα καταπολέμησης στην περιοχή. Τα συγκεκριμένα μέτρα δεν εξάλειψαν τα κρούσματα και κρίθηκε απαραίτητο να εφαρμοστεί πρόγραμμα μαζικής καταπολέμησης της ελονοσίας στην περιοχή που συνεχίστηκε και την περίοδο 2013-2014 με τη χρήση χλωροκίνης και πριμακίνης στους μετανάστες που ζούσαν στο επίκεντρο της ελονοσίας το 2011. Χίλιοι ενενήντα τέσσερις (1094) μετανάστες ολοκλήρωσαν επιτυχώς τη θεραπεία, που αντιστοιχεί στο 87,3% του πληθυσμού στόχου. Η επιτυχία του προγράμματος αποδεικνύεται από το γεγονός πως το 2013 και το 2014 δεν καταγράφηκαν κρούσματα ελονοσίας στη συγκεκριμένη περιοχή (Tseroni et al., 2015).

Δάγκειος πυρετός

Ο δάγκειος πυρετός προκαλείται από έναν ιό της οικογένειας *Flaviviridae*, το γένος *Flavivirus* και είναι μια ιογενής ασθένεια που μεταδίδεται από τα κουνούπια, ευρέως διαδεδομένη σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές. Το *Aedes aegypti* έχει αναγνωριστεί ως πρωτεύων διαβιβαστής του δάγκειου πυρετού, προκαλώντας μεγάλες επιδημίες στην Αμερική και τη Νοτιοανατολική Ασία. Η παγκόσμια συχνότητα του δάγκειου πυρετού έχει επίσης αυξηθεί τα τελευταία 25 χρόνια (Jansen et al., 2010; Stanaway et al., 2016). Στην Ευρώπη, η παρουσία του έχει συνδεθεί με την αυτόχθονη μετάδοση του δάγκειου πυρετού στην Κροατία (2010), στη Γαλλία (2010, 2013–2015) και στην Ισπανία (2014–2016) (Gossner et al., 2018). Την περίοδο 1927-1928 καταγράφηκαν κρούσματα τόσο στην Ελλάδα (Αθήνα) όσο και σε γειτονικές χώρες (Rosen, 1986; Schaffner & Mathis, 2014). Το 2012, ένα μεγάλο ξέσπασμα δάγγειου πυρετού σημειώθηκε στην Πορτογαλική Αυτόνομη Περιφέρεια της Μαδέρας (Sousa et al., 2012).

Αν και γενικά θεωρείται δευτερεύων διαβιβαστής του δάγγειου πυρετού μετά το *Ae. aegypti*, το *Ae. albopictus* έχει συσχετιστεί με τη μετάδοση του ιού

από τα μέσα του δέκατου ένατου αιώνα (Paupy et al., 2009) και τις επιδημίες στη Χαβάη (Effler et al., 2005), στη νήσο La Reunion, στο Μαυρίκιο (Pierre et al., 2005; Ramchurn et al., 2009,), στην Κίνα, την Ιαπωνία και τις Σεϋχέλλες (Gratz et al., 2004).

Chikungunya

Ο ιός εντοπίστηκε για πρώτη φορά στην Τανζανία το 1953 και μεταδίδεται κυρίως από το *Ae. aegypti* (de Lamballerie et al., 2008) αλλά και από το *Ae. albopictus*. Έχει προκαλέσει επιδημίες στην Αφρική και στην Ασία. Ειδικότερα, το 2005-2006 σημειώθηκε επιδημία στον Ινδικό Ωκεανό. Εισαγόμενα κρούσματα εντοπίστηκαν στην Ασία, την Αυστραλία, τις ΗΠΑ, τον Καναδά και την ηπειρωτική Ευρώπη. Το 2007, διαγνώστηκαν αυτόχθονες λοιμώξεις στην Ευρώπη (Ιταλία) και το 2010 και το 2014 αναφέρθηκαν στη Γαλλία (Gossner et al., 2018). Το 2013, ο ιός εμφανίστηκε στην Καραϊβική και γρήγορα εξαπλώθηκε στην Αμερική. Στις μέρες μας, ο ιός έχει εξαπλωθεί σε (υπο) - τροπικές περιοχές της Αμερικής, της Αφρικής και της Ασίας. Ο κίνδυνος εξάπλωσης του ιού στην ΕΕ είναι υψηλός από ταξιδιώτες (ιδιαίτερα γύρω από τις ακτές της Μεσογείου) (CDC, 2023).

1.2 Η σημασία των κουνουπιών για τη χώρα μας

1.2.1 Τα σημαντικότερα κουνούπια της Ελλάδας

Το πρώιμο ενδιαφέρον για τα κουνούπια της Ελλάδας σχετιζόταν με στρατιωτικές επιχειρήσεις στη Μακεδονία, όπου η ελονοσία αποτελούσε πρόβλημα δημόσιας υγείας (Cot & Hovasse, 1917; Joyeux, 1918; Niclot, 1917; Waterston, 1918a). Η Ελλάδα είχε τον υψηλότερο επιπολασμό ελονοσίας από όλες τις ευρωπαϊκές χώρες στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, με μια από τις μεγαλύτερες επιδημίες (960.000 άτομα) το 1905 (Vine et al., 1948). Η ελονοσία ήταν ενδημική μέχρι τη δεκαετία του 1960. Με το Παγκόσμιο Πρόγραμμα Εκρίζωσης από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), η χώρα επίσημα απαλλάχθηκε από την ελονοσία το 1974 (Bruce-Chwatt et al., 1975) με πρόγραμμα καταπολέμησης που περιλάμβανε: παθητική και ενεργητική ανίχνευση, ριζική εξάλειψη του πλασμωνδίου της ελονοσίας *P. vivax* σε λοιμώξεις και καταπολέμηση των κουνουπιών με υπολειμματικό ψεκασμό

εσωτερικού χώρου (IRS), προνυμφοκτονία και προνυμφοφάγα ψάρια (*Gambusia* sp.) σε ορυζώνες (Bruce-Chwatt et al., 1975; Libadas, 1958). Επίσης, την δεκαετία 1960 - 1970, η Ελλάδα βελτίωσε τις κοινωνικοοικονομικές συνθήκες στις αγροτικές περιοχές με ευημερία και καλύτερες συνθήκες στέγασης, ιατρική περίθαλψη, περιβαλλοντική υγιεινή, εγκαταστάσεις εκπαίδευσης και δίκτυο αγροτικών κέντρων υγείας και ιατρικών σταθμών (Bruce-Chwatt & Zulueta, 1980). Αποτέλεσμα ήταν η εξάλειψη της ελονοσίας αλλά παράλληλα σταμάτησαν και οι έρευνες για τα κουνούπια, με συνέπεια την ανάπτυξή τους μετέπειτα σε υπερβολικούς πληθυσμούς δημιουργώντας όχι μόνο δυσχερείς καταστάσεις επιβίωσης αλλά και θέτωντας σε κίνδυνο τη δημόσια υγεία (Βογιατζόγλου – Σαμανίδου, 2011).

Οι κατάλογοι τόσο των Anophelinae όσο και των Culicidae ξεκίνησαν να δημοσιεύονται από τους Waterston (1918a) και Joyeux (1918). Ο συνολικός αριθμός των ειδών κατανεμημένος σε έξι γένη ήταν 28. Ο Cardamatis (1931a) ήταν ο πρώτος που κατέγραψε τα γνωστά είδη κουνουπιών από όλη την Ελλάδα καταμετρώντας 19. Ο πληρέστερος κατάλογος ήταν του Pandazis (1932, 1935), σημειώνοντας 38 είδη σε επτά γένη. Αργότερα, ο Peus (1954) κατέγραψε 24 είδη ενώ Sakellariou and Lane (1977) απαρίθμησαν 38 είδη.

Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι το μοναδικό είδος του συμπλέγματος *Cx. pipiens* που εμφανίζεται στην Ελλάδα είναι το *Cx. pipiens* Mattingly (1951), γεγονός που καταγράφηκε και από τον Barr (1957) ενώ ο Cardamatis (1931a) λανθασμένα κατέγραψε το *Cx. quinquefasciatus* Say ως *Culex fatigans* Wiedemann. Το *Ae. aegypti* έχει καταγραφεί στην Ελλάδα από τους Waterston (1918a), Joyeux (1918) και Ekblom (1929) ως *Stegomyia fasciata* Fabricius, Cardamatis (1931a, ως *Culex elegans* Ficalbi) και Pandazis (1932) ως *Aedes argenteus* Poiret. Στα χρόνια που η εκρίζωση της ελονοσίας βρισκόταν ακόμη σε εξέλιξη (Livadas, 1958), οι πληθυσμοί του *Ae. aegypti* μειώθηκαν σημαντικά. Ωστόσο, η επανεμφάνισή του σε ευρωπαϊκές χώρες και η παλαιότερη ύπαρξή του στην Ελλάδα αυξάνει τον κίνδυνο επανεισόδου και εγκατάστασης στη χώρα μας (Yunichewa et al., 2008). Σχετικά με τα είδη του γένους *Anopheles* οι αναφορές είναι πολύ περισσότερες σε σχέση με τα υπόλοιπα γένη καθώς συνδέονται με την προσπάθεια καταπολέμησης της ελονοσίας και συνεπώς

εξετάζονταν πιθανές εστίες ανάπτυξης προνυμφών ανωφελών, ενώ σε πιθανή αναγνώριση κοινών κουνουπιών γίνονταν απλή αναφορά χωρίς λεπτομέρειες.

Οι Samanidou-Voyadjoglou & Darsie (1993a) δημιούργησαν έναν κατάλογο για τα κουνούπια της Ελλάδας που περιελάμβανε 7 γένη, 15 υπογένη, 53 είδη και 2 υποείδη και αμέσως μετά οι ίδιοι Samanidou-Voyadjoglou & Darsie (1993b) πρόσθεσαν 3 νέες καταγραφές (*Culex pusillus*, *Aedes annulipes* και *Aedes berlandi*). Οι Kaiser και συνεργάτες (2001) πρόσθεσαν στον κατάλογο 4 νέα είδη που βρέθηκαν στη βόρεια Ελλάδα (*Ochlerotatus punctor*, *Ochlerotatus pullatus*, *Ochlerotatus cataphylla* και *Ochlerotatus sticticus*). Το 2003 και το 2005 προστέθηκαν το *Ae. albopictus* και το *Culex tritaeniorhynchus* (Samanidou & Harbach, 2003; Samanidou – Voyadjoglou et al., 2005). Το 2011 η Βογιατζόγλου – Σαμανίδου δημοσίευσε τον τελευταίο κατάλογο των ειδών κουνουπιών που υπάρχουν στην Ελλάδα με 64 είδη, 2 υποοικογένειες και 8 γένη (Βλέπε Παράρτημα Ι).

Σε έρευνα των Παρα και συν. (2011) το έτος 2010 πραγματοποιήθηκαν συλλήψεις ενήλικων κουνουπιών στις περιφέρειες της Ημαθίας, του Κιλκίς, της Πέλλας, της Πιερίας και της Θεσσαλονίκης με την πλειοψηφία να ανήκει στο γένος *Culex*, ενώ υπήρξαν και ενήλικα του γένους *Aedes* και *Anopheles*. Επίσης, σε έρευνα των Patsoula και συν. (2016) τα έτη 2011 και 2012 το πιο πολυπληθές είδος ήταν το *Cx. ripiens*, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό ανήκε στο *Ochlerotatus caspius* στην Περιφέρεια Ανατολικής Μακεδονίας και Θράκης. Όμοια ήταν τα αποτελέσματα της έρευνας και το 2013 στην Περιφέρεια Αττικής ενώ βρέθηκε σε αγροτική περιοχή και το *Anopheles sacharovi* Favre 1903.

Οι Spanoudis και συν. (2021) τα έτη 2012-2013 ταυτοποίησαν σε επίπεδο είδους προνύμφες και νύμφες από την Περιφερειακή Ενότητα Θεσσαλονίκης 4 γένη με το πιο κοινό είδος να είναι το *Cx. ripiens*, ενώ ακόμη ταυτοποιήθηκαν το *Ae. caspius* και τα *Anopheles hyrcanus* και *Anopheles maculipennis* από αγροτικές περιοχές. Το γένος *Culiseta* καταγράφηκε μόνο τον Ιούνιο του 2013 σε χαμηλούς πληθυσμούς.

Την περίοδο 2014 – 2016 η παγίδευση κουνουπιών σε 12 περιφέρειες της χώρας είχε ως αποτέλεσμα την αναγνώριση 20 ειδών κουνουπιών από έξι γένη. Το 2014, συλλέχθηκε το μεγαλύτερο μέρος των κουνουπιών που

αποτελούνταν από 16 είδη και πέντε γένη, ενώ το 2015 και το 2016 αναγνωρίστηκαν 14 είδη από 6 γένη καθώς και 18 είδη από 6 γένη, αντίστοιχα. Επίσης, εντομολογικά δεδομένα από Αττική, Κρήτη, Ανατολική Μακεδονία, Θράκη και Βόρειο Αιγαίο έδειξαν πως τα είδη με τη μεγαλύτερη αφθονία ήταν το *Cx. pipiens* και το *Ae. caspius* (Patsoula et al., 2019).

Σε έρευνα των Vakali & συν. (2023) την χρονική περίοδο 2019 και 2020 συλλέχθηκαν ενήλικα κουνούπια σε 12 περιοχές που περιλαμβάνονται στο Εθνικό Πρόγραμμα Εντομολογικής Επιτήρησης του Εθνικού Οργανισμού Δημόσιας Υγείας (ΕΟΔΔΥ). Το 2019 η πλειοψηφία των κουνουπιών ήταν θηλυκά και ταξινομήθηκαν σε 6 γένη και 14 είδη, ενώ το 2020 ταξινομήθηκαν σε 6 γένη και 16 είδη. Η σύνθεση των ειδών μεταξύ των περιοχών ήταν διαφορετική, ωστόσο το *Cx. pipiens* και το *Aedes caspius* αποτελούσαν την πλειοψηφία. Τέσσερα είδη εξ' αυτών είναι μείζονος ιατρικής σημασίας και είναι το *An. sacharovi*, *An. maculipennis*, *Cx. pipiens* και *Ae. albopictus*

Οι Bisia & συν. (2020) στο Παλαιό Φάληρο και στην Αργολίδα συνέλεξαν ενήλικα του συμπλόκου *Cx. pipiens*, *Ae. albopictus*, *Culiseta longiareolata* και *Ae. caspius* όπως είχε φανεί και σε προηγούμενες έρευνες (Badieritakis et al., 2018; Darsie et al., 1997; Kioulos et al., 2014). Η παρουσία των *Cx. pipiens* f. *pipiens* και *Cx. pipiens* f. *molestus*, καθώς και των υβριδίων τους στην Αττική και στην Πελοπόννησο συνάδει με παλαιότερες έρευνες στην Ελλάδα (Bahnck & Fonseca, 2006; Linke et al., 2007; Zित्रa et al., 2016). Σύμφωνα με την έρευνα το *Cx. pipiens* f. *pipiens* βρίσκεται σε αφθονία στο Παλαιό Φάληρο ενώ το *Cx. pipiens* f. *molestus* και τα υβρίδια βρίσκονται στην ίδια αναλογία. Στην Αργολίδα οι βιότυποι του συμπλέγματος *Cx. pipiens* αποτελούσαν τα $\frac{3}{4}$ του δείγματος και τα υβρίδια το υπόλοιπο $\frac{1}{4}$ του πληθυσμού. Ο πληθυσμός υβριδίων ήταν υψηλός και όμοιος ακόμη και μετά την έξαρση του 2017 (Mavridis et al., 2018).

Τα έτη 2018–2020 συλλέχθηκαν στην Κρήτη ενήλικα κουνούπια με την πλειοψηφία του δείγματος να προέρχεται από τους δυτικούς νομούς (Χανιά και Ρέθυμνο). Τα κουνούπια του γένους *Culex* αντιπροσώπευαν την πλειοψηφία των κουνουπιών από νομό/έτος επιτήρησης, ακολουθούμενα από τα γένη *Aedes*, *Culiseta*, *Anopheles* και *Uranotaenia*. Στο γένος *Aedes*, η πλειοψηφία των δειγμάτων άνηκε στο *Ae. albopictus*, ενώ ένας μικρός αριθμός δειγμάτων

αναγνωρίστηκε ως *Aedes cretinus*. Μεταξύ των ανωφελινών κουνουπιών ταυτοποιήθηκαν μορφολογικά 3 είδη που ήταν το *Anopheles claviger*, το *Anopheles algeriensis* και το *Anopheles superpictus* (Fotakis et al., 2022).

Οι κλιματολογικές συνθήκες και το ανάγλυφο της Ελλάδας είναι ευνοϊκά για την ανάπτυξη πληθυσμών κουνουπιών του *Cx. pipiens* (*Cx. pipiens* f. *pipiens*, *Cx. pipiens* f. *molestus*) ενώ ταυτόχρονα οι πληθυσμοί του *Aedes* (*Ae. albopictus*, *Oc. caspius*) με την πάροδο των χρόνων προσαρμόζονται στο νέο περιβάλλον, ενώ πολλοί μικρότεροι είναι οι πληθυσμοί του *Anopheles*. Ιδιαίτερη σημασία έχει και η εποχικότητα του κάθε είδους καθώς σχετίζεται με την εμφάνιση μολυσματικών για τον άνθρωπο ασθενειών. Συνεπώς, ο συνδυασμός κλιματολογικών και δημογραφικών δεδομένων είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη εξειδικευμένων πρωτοκόλλων καταπολέμησης για κάθε είδος και για την ανάπτυξη στρατηγικών αποτελεσματικής διαχείρισης της μετάδοσης πιθανής μόλυνσης ώστε να αποκοπεί η επιμόλυνση περισσότερων ανθρώπων.

1.2.2 Τα σημαντικότερα είδη κουνουπιών της Θεσσαλίας

Το οικοσύστημα στη Θεσσαλία χαρακτηρίζεται από μια μεγάλη πεδιάδα (τη μεγαλύτερη στην Ελλάδα) με πολλά ποτάμια, ρυάκια, κανάλια και υγροβιότοπα δάση, που αποτελούν σημαντικούς βιότοπους για πολλά είδη πτηνών και άγριας ζωής. Το σιτάρι, το καλαμπόκι και το βαμβάκι είναι τα κύρια γεωργικά προϊόντα στην περιοχή.

Συνεπώς, η μορφολογία, το μέγεθος και η κλίμακα των αγροτικών δραστηριοτήτων σε συνδυασμό με τις ανθρωπογενείς αλλαγές που πραγματοποιούνται στο ανάγλυφο της περιοχής όπως η αποψίλωση των δασών, η επέκταση της άρδευσης, η εγκατάσταση των κατοίκων της σε νέες περιοχές στο πλαίσιο της παγκοσμιοποίησης καθώς και η περαιτέρω αύξηση της παραγωγής και της ανταγωνιστικότητας των παραγόμενων προϊόντων συντελεί στην αύξηση των τεχνητών εστιών που παρέχουν διάφορους τύπους οικοτόπων για την αναπαραγωγή κουνουπιών (Amusan et al., 2005; McIntyre, 2000). Έτσι, οι πολλαπλές εστίες αναπαραγωγής ενηλίκων και εκτροφής προνυμφών σε συνδυασμό με άμεση πρόσβαση σε πληθώρα θηλαστικών και πουλιών για πολλαπλά γεύματα αίματος από τα ενήλικα κουνούπια συντελούν στη μετάδοση μολυσματικών ασθενειών σε πουλιά, ανθρώπους και άλλα θηλαστικά. Επίσης, η πεδιάδα της Θεσσαλίας φιλοξενεί και πολλά είδη πτηνών της οικογένειας Corvidae (κορακοειδή) που αποτελούν φορείς του ΙΔΝ (Valiakos et al., 2014) και συνεπώς αυξάνει ο κίνδυνος μετάδοσης της ασθένειας (Buckley et al., 2003).

Οι πρώτες καταγραφές κουνουπιών στη Θεσσαλία ξεκινούν από το 1900 για αρκετά είδη κουνουπιών. Λεπτομερή στοιχεία για την περιοχή και τον είδος του κουνουπιού που καταγράφηκε δίνονται στον ακόλουθο Πίνακα (1.2).

Καταγραφές των κουνουπιών της Θεσσαλίας		
Περιοχή	Είδος κουνουπιού	Βιβλιογραφία
Λάρισα	<i>An. algeriensis</i> (Theobald)	(Moutoussis, 1933)
	<i>An. claviger</i> (Meigen)	(Μανουσάκης, 1939; Σάββας & Καρδαμάτης, 1912)
	<i>An. hyrcanus</i> (Pallas)	(Moutoussis, 1933)
	<i>An. sacharovi</i> (Favre)	(Moutoussis, 1933; Λιβαδάς & Σφάγγος, 1940b; Λιβαδάς & συν., 1949; Μανουσάκης, 1939; Μουτούσης, 1933)
	<i>An. superpictus</i> (Grassi)	(Moutoussis, 1933; Pantazis, 1935; Καρδαμάτης, 1908; 1912; Λιβαδάς & Σφάγγος, 1940b; Λιβαδάς & συν., 1949)
	<i>Orthopodomyia pulcripalpis</i> (Rondani)	(Pantazis, 1935)
Μαγνησία	<i>An. algriensis</i> (Theobald)	(Moutoussis, 1933)
	<i>An. claviger</i> (Meigen)	(Μανουσάκης, 1939; Σάββας & Καρδαμάτης, 1912)
	<i>An. hyrcanus</i> (Pallas)	(Moutoussis, 1933)
	<i>An. sacharovi</i> (Favre)	(Moutoussis, 1933; Λιβαδάς & Σφάγγος, 1940b; Λιβαδάς & συν., 1949; Μανουσάκης, 1939; Μουτούσης, 1933)
	<i>An. superpictus</i> (Grassi)	(Moutoussis, 1933; Pantazis, 1935; Καρδαμάτης, 1908; Λιβαδάς & Σφάγγος, 1940b; Λιβαδάς & συν., 1949; Μανουσάκης, 1939; Σάββας & Καρδαμάτης, 1908; Σάββας & Καρδαμάτης, 1912)
	<i>Oc. caspius</i> (Pallas)	(Γεροφώτης και συν., 2013)

Καρδίτσα

<i>An. claviger</i> (Meigen)	(Μανουσάκης, 1939)
<i>An. maculipennis</i> (Meigen)	(Καρδαμάτης, 1908; Λιβαδάς & Σφάγγος, 1940b; Λιβαδάς & συνεργάτες, 1949; Μανουσάκης, 1939)
<i>An. sacharovi</i> (Favre)	(Λιβαδάς & Σφάγγος, 1940b; Λιβαδάς & συν., 1949; Μανουσάκης, 1939)
<i>An. superpictus</i> (Grassi)	(Samanidou-Voyadjoglou & Harbach, 2001; Καρδαμάτης 1908; Λιβαδάς & Σφάγγος, 1940b; Μανουσάκης, 1939)

Τρίκαλα

<i>An. claviger</i> (Meigen)	(Μανουσάκης, 1939)
<i>An. maculipennis</i> (Meigen)	(Λιβαδάς & Σφάγγος, 1940b; Λιβαδάς & συνεργάτες, 1949; Μανουσάκης, 1939)
<i>An. sacharovi</i> (Favre)	(Moutoussis, 1933; Pantazis, 1935; 1939 Λιβαδάς & Σφάγγος, 1940b; Μανουσάκης, 1939)
<i>An. superpictus</i> (Grassi)	(Pantazis, 1935; Καρδαμάτης, 1908; Λιβαδάς & Σφάγγος, 1940b; Λιβαδάς & συν., 1949; Μανουσάκης, 1939)

Από τα στοιχεία της επιδημιολογικής επιτήρησης την περίοδο 2009 – 2012 προκύπτουν κρούσματα εγχώριας μετάδοσης της ελονοσίας με την παρουσία του κουνουπιού *Anopheles*, αλλά χωρίς την ταυτοποίηση κάποιου συγκεκριμένου είδους τόσο στο Δήμο Αγιάς στη Λάρισα όσο και στο Δήμο Σοφάδων στην Καρδίτσα (ΕΟΔΥ, 2012).

Το 2011 η Περιφέρεια Θεσσαλίας χαρτογράφησε τις εστίες αναπαραγωγής κουνουπιών (*Culex*, *Aedes*, *Anopheles*) και δημιούργησε χάρτες στη Λίμνη Κάρλα στην Καρδίτσα και στο Δέλτα του Πηνειού ποταμού στα παράλια της Λάρισας, με βάση την πιθανότητα παραγωγής κουνουπιών κουνουπιών του είδους *Culex* sp., *Anopheles* sp. και *Aedes caspius/Aedes*

detritus. Η εντομολογική επιτήρηση Μάιος-Οκτώβριος 2012 ενηλίκων κουνουπιών στις Περιφερειακές Ενότητες Καρδίτσας, Λάρισας, Μαγνησίας και Τρικάλων έδειξε πολυπληθέστερο γένος το *Culex* με τις συλλήψεις να βρίσκονταν κοντά στις συνολικές κάθε περιοχής, ενώ το γένος *Aedes* βρέθηκε σε κανονικά επίπεδα και το *Anopheles* σε χαμηλά, αποδεικνύοντας την παρουσία των διαβιβαστών της ελονοσίας στην περιοχή (ΕΟΔΥ, 2012). Την περίοδο Ιούλιο-Νοέμβριο 2014 η εντομολογική επιτήρηση στην Περιφερειακή Ενότητα Καρδίτσας και Λάρισας ταυτοποίησε 9 είδη κουνουπιών (*Cx. pipiens*, *Ae. albopictus*, *Ae. caspius*, *Ae. detritus*, *An. claviger*, *An. maculipennis*, *An. sochorovi*, *Culiseta longioreoloto*, *Culiseta annulata*, *Anopheles* spp. και *Aedes* spp.). Στη Περιφερειακή Ενότητα Λάρισας πολυπληθέστερο είδος ήταν το *Oc. caspius*, ενώ καταγράφηκαν και τα είδη *Cx. pipiens*, *An. sacharovi* και *Ae. albopictus* (ΕΟΔΥ, 2014)

Δειγματοληψίες στη λίμνη Κάρλα ταυτοποίησαν μοριακά το 50% των κουνουπιών στο είδος *Cx. pipiens*, το 44% στο *Oc. caspius* και το 0,5% στο *Aedes vexans* και στο *Anopheles labranchiae* (Πεππέ, 2015). Σε έρευνα στη Λάρισα την περίοδο Μάιος 2014 – Ιανουάριος 2015 βρέθηκαν τρία γένη κουνουπιών (*Culex*, *Aedes/Ochlerotatus*, *Anopheles*) με κυρίαρχο το γένος *Culex* (91,2%) ενώ ακολουθούσε το γένος *Aedes/Ochlerotatus* (8,48%) και ακολούθως το γένος *Anopheles* (Mastronikolos, 2014).

Το 2019 συλλέχθηκαν κουνούπια του γένους *Culex* την περίοδο Ιούλιο-Αύγουστο από τρεις περιοχές της Θεσσαλίας (Λάρισα, Καρδίτσα και Τρίκαλα). Στη Λάρισα ταυτοποιήθηκαν 10 άτομα σε επίπεδο βιότυπου (Bahnck & Fonseca, 2006; Smith & Fonseca, 2004) και όλα ήταν *Cx. pipiens* (6 *Cx. pipiens* και 4 υβρίδια). Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και σε περιοχές με κουνούπια θετικά στον ΙΔΝ σε προηγούμενες έρευνες στην Ελλάδα (Para et al., 2013; Para et al., 2019).

Σε έρευνα των Vakali & συν. (2022) υπό την αιγίδα του Εθνικού Οργανισμού Δημόσιας Υγείας (ΕΟΔΥ) την περίοδο 2019 – 2020 η Θεσσαλία και τις δύο χρονιές ήταν 4^η σε συλλήψεις κουνουπιών σε σχέση με όλες τις Περιφέρειες της χώρας. Το έτος 2019 το 92.9% των κουνουπιών ήταν θηλυκά και η ταυτοποίηση με τις κλειδες Samanidou-Voyadjoglou & Harbach και Darsie

& Samanidou-Voyadjoglou έδειξε 6 γένη και 14 είδη, με πολυπληθέστερα το *Cx. pipiens* (61%) και το *Ae. caspius* (14%). Το έτος 2020 το 94% των κουνουπιών ήταν θηλυκά με 6 γένη και 16 είδη, ενώ και πάλι πολυπληθέστερα ήταν το *Cx. pipiens* (57%) και το *Ae. caspius* (33%) (ΕΟΔΥ, 2020).

Στην ετήσια εντομολογική επιτήρηση του ΕΟΔΥ για το 2021 η Θεσσαλία είχε συλλήψεις κουνουπιών με την εξής αναλογία: *Cx. pipiens* 86.08%, *Ae. caspius* 8,05%, *Ae. vexans* 2,32% και *Coquilleltidia richiardi* 1,5% (ΕΟΔΥ, 2021).

Το πλούσιο ανάγλυφο της Θεσσαλίας καθώς και η αγροτική δραστηριότητα των κατοίκων της δημιουργούν ευνοϊκές συνθήκες για ανάπτυξη εστιών αναπαραγωγής κουνουπιών. Οι προαναφερθείσες μελέτες επιβεβαιώνουν τη συγκεκριμένη υπόθεση με τα υψηλά ποσοστά ενηλίκων κουνουπιών και δη θηλυκών από όλα τα γένη καθώς και με αρκετά είδη ανά γένος. Συνεπώς, η συνύπαρξη εστιών αναπαραγωγής κουνουπιών, ζώων και ανθρώπων σε συνδυασμό με ευνοϊκότερες συνθήκες ανάπτυξης και αναπαραγωγής των κουνουπιών οδηγεί σε επικίνδυνη αύξηση του κινδύνου μόλυνσης, επιμόλυνσης και μετάδοσης επιβλαβών ασθενειών από τα κουνούπια στους ανθρώπους και στα ζώα με οικονομικές, κοινωνικές επιπτώσεις καθώς και δυσμενείς επιπτώσεις στη δημόσια υγεία με ανυπολόγιστο κόστος.

1.3 Το κοινό κουνούπι *Cx. pipiens* και οι βιότυποί του

1.3.1 Ταξινομική θέση

Το *Cx. pipiens* (Linnaeus, 1758) αποτελεί σύμπλεγμα ειδών και αναφέρεται ως «κοινό κουνούπι». Χαρακτηριστικός είναι ο υβριδισμός στην Ασία μεταξύ του *Cx. pipiens* και του *Cx. quinquefasciatus*, με την ονομασία *pallens* (Harbach, 2012). Στην Ευρώπη ταξινομικά θεωρείται ένα πλαστικό είδος με δύο μορφές (ή βιοτύπους) και με τα υβρίδια τους: το *pipiens* και το *molestus*. Το *Culex torrentium* θεωρείται αδελφό είδος και το άλλο στενά συγγενικό, το *Culex globocoxitus*, συνδέεται σε υψηλότερο ταξινομικό επίπεδο (δηλαδή υποομάδα *pipiens*).

Γεωγραφική κατανομή

Το *Cx. pipiens* ζει σε εύκρατες περιοχές και σε αστικά περιβάλλοντα της Ευρώπης, της Ασίας, της Αφρικής, της Αυστραλίας και της Βόρειας και Νότιας Αμερικής. Στην Ευρώπη βρίσκεται σε όλες τις ευρωπαϊκές χώρες, εκτός από την Ισλανδία και τις Νήσους Φερόε ενώ παρατηρείται σε όλες τις χώρες της Μέσης Ανατολής και της Βόρειας Αφρικής. Δεν υπάρχουν στοιχεία για πρόσφατη εξάπλωση του *Cx. pipiens* σε νέες περιοχές, αλλά η παρουσία του στην Αμερική, την Ασία και την Αυστραλία οφείλεται στις μεταφορές με πλοία (Harbach, 2012). Η αναφερόμενη παρουσία του μπορεί να είχε υπερεκτιμηθεί σε μέρη της Ευρώπης (βόρεια των Άλπεων) λόγω πιθανής σύγχυσης με το *Cx. torrentium* (Hesson et al., 2014).

Το *Cx. pipiens* μπορεί να διαφοροποιηθεί από όμοια είδη όπως το *Cx. torrentium* μόνο με εξέταση στον γενετικό οπλισμό (Rudolf et al., 2013). Το *Cx. quinquefasciatus* φέρει κοιλιακές ζώνες στο σχήμα του μισοφέγγαρου ενώ το *Cx. pipiens* έχει πιο κανονικό σχήμα και είναι πιο λεπτές, (Becker et al., 2010) με την ταυτοποίηση του είδους και των υβριδίων να γίνεται μοριακά (Bahnck et al., 2006; Rudolf et al., 2013). Άλλα ευρωπαϊκά είδη *Culex* έχουν επίσης κανονικές ζώνες στην κοιλιακή χώρα. Τα *Cx. perexiguus* και *Cx. univittatus* έχουν ζώνες που διαμορφώνονται από λευκές κλίμακες (κίτρινες για το *Cx. pipiens*) όπως και για το *Cx. laticinctus*, το οποίο έχει μεγαλύτερη κοιλιακή ταινία (καλύπτει το 1/2 μέχρι τα 2/3 του κοιλιακού τμήματος ενώ η ίδια ταινία καλύπτει λιγότερο από το 1/2 του κοιλιακού τμήματος για το *Cx. pipiens*) (Becker et al., 2010; Günay et al., 2015).

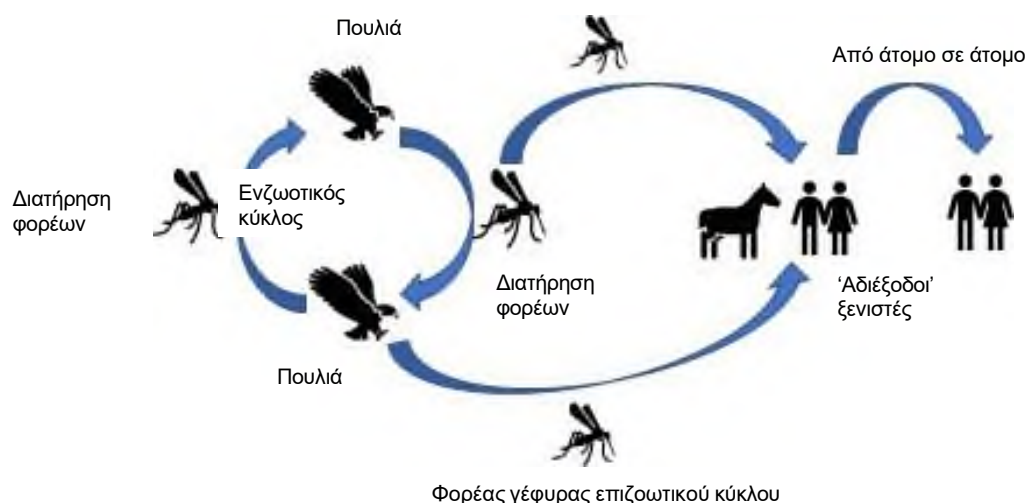
Βιότυποι του *Cx. pipiens*

Το *Cx. pipiens* παρουσιάζει δύο βιότυπους, τον βιότυπο *Cx. pipiens* f. *pipiens* και τον βιότυπο *Cx. pipiens* f. *molestus*. Ιστορικά, ο βιότυπος *Cx. pipiens* f. *molestus* έχει αναφερθεί στο μετρό του Λονδίνου το 1940 (Shute, 1951) όπου υπήρχε συνωστισμός ανθρώπων για να προφυλαχθούν από τον πόλεμο, καθώς και σε άλλες ευρωπαϊκές πόλεις σε μέρη κάτω από το έδαφος από τη δεκαετία του 1920s (Jobling, 1938; Mattingly, 1951) ενώ ο βιότυπος *Cx.*

ripiens f. *ripiens* βρίσκεται σε χερσαία μέρη. Με την αστικοποίηση ο βιότοπος *Cx. ripiens* f. *molestus* βρέθηκε και σε μέρη πάνω από το έδαφος (de Boissezon, 1929; Huff, 1929; Legendre, 1931; Roubaud, 1929; Wesenberg-Lund, 1920) όπου συνυπάρχει και υβριδίζεται με τον *Cx. ripiens* f. *ripiens*.

Ο βιότοπος *Cx. ripiens* f. *ripiens* αποικίζει υδάτινα οικοσυστήματα, είναι ευρυγαμικός (σύζευξη σε εξωτερικούς χώρους), αναυτογενής (λαμβάνει γεύμα αίματος για την ωρίμανση των ωών) και τρέφεται σε πτηνά, ενώ ο βιότοπος *Cx. ripiens* f. *molestus* που απαντάται σε υπόγεια ύδατα, είναι στενογαμικός (σύζευξη σε περιορισμένο χώρο), αυτογενής (πρώτη συστάδα αυγών χωρίς γεύμα αίματος) και προτιμά θηλαστικά και τον άνθρωπο για την διατροφή του (Di Luca et al. 2016; Vinogradova, 2000).

Εργαστηριακά πειράματα έχουν δείξει ότι οι ευρωπαϊκοί πληθυσμοί των βιοτύπων *Cx. ripiens* f. *ripiens* και *Cx. ripiens* f. *molestus* παρουσιάζουν ευαισθησία στη μόλυνση από τον ΙΔΝ και μπορούν να τον μεταδώσουν, με το επίπεδο να εξαρτάται από τη γενεαλογία του ιού (Martinet J-P, 2019). Με βάση την ικανότητα του φορέα και τη συχνότητα της φυσικής μόλυνσης ο βιότοπος *Cx. ripiens* f. *ripiens* θεωρείται ως κύριος φορέας στη μετάδοση του ΙΔΝ: παίζει ρόλο ως ενισχυτικός φορέας στον ενζωτικό κύκλο (μετάδοση από τα πουλιά στα πουλιά), ως φορέας γέφυρας στον επιζωτικό κύκλο (μετάδοση από τα πουλιά στα θηλαστικά) και ως δεξαμενή του ιού (Balenghien et al., 2008; Calzolari et al., 2015; Farajollahi et al., 2011; Rudolf et al., 2017; Savage et al., 1999) (Εικόνα 1.7).



Εικόνα 1.7 Ο ρόλος του *Cx. pipiens* στη μετάδοση και συντήρηση του ΙΔΝ (τροποποιημένο, πηγή: Danis et al., 2012)

Παρόλα αυτά, για να διευκρινιστεί ο ρόλος του *Cx. pipiens* στη συντήρηση και μετάδοση του WNV είναι απαραίτητο να κατανοήσουμε τη βιολογία των διαφορετικών μορφών, των πληθυσμών και των υβριδίων του, τα οποία θα μπορούσαν όλα να διαδραματίσουν ιδιαίτερους ρόλους. Στην πραγματικότητα, ο βιότοπος *Cx. pipiens* f. *pipiens* τρέφεται κυρίως με πουλιά, πιθανότατα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον ενζωτικό κύκλο, ενώ ο βιότοπος *Cx. pipiens* f. *molestus* και τα υβρίδια που τρέφονται τόσο με πτηνά όσο και με θηλαστικά και είναι πιο πιθανό να παίζουν το ρόλο ενός φορέα γέφυρας στον επιζωτικό κύκλο (Vogels et al., 2017).

1.3.2. Βιολογία του *Cx. pipiens*

Τα ωά είναι μικρά, επιμήκη και κατά την απόθεση είναι μαλακά και ανοιχτόχρωμα (υπόλευκα) ενώ με την πάροδο του χρόνου γίνονται τεφρά και μελανά (Μπέτζιος, 1989). Ο αριθμός των ωών κυμαίνεται από 40 – 500 ανά συστάδα και τα θηλυκά έχουν τη δυνατότητα να ωοτοκήσουν έως και 6 φορές κατά την διάρκεια της ζωής τους. Τα ωά στις υδάτινες συλλογές, προσκολλώνται μεταξύ τους κατά την απόθεση και σχηματίζουν ένα είδος σχεδίας (Βογιατζόγλου – Σαμανίδου, 2011). Τα θηλυκά ωοτοκούν στην επιφάνεια του νερού και οι προνύμφες και εκκολάπτονται μετά από 1-3 ημέρες, ανάλογα με τις συνθήκες. Η θερμοκρασία επηρεάζει και τη διάρκεια ανάπτυξης των προνυμφών μέχρι τη νύμφωση και εν τέλει την ενηλικίωση (Schaffner et al., 2001).

Οι προνύμφες αναπτύσσονται σε φυσικές προσωρινές ή μόνιμες πηγές νερού όπως λίμνες με βλάστηση, ορυζώνες, στάσιμα νερά ποταμών, λακκούβες και αυλάκια και τρύπες δέντρων ή ανθρωπογενείς πηγές νερού όπως πλημμυρισμένα κελάρια, αποχετεύσεις δρόμων, λάκκους, βαρέλια νερού και σε κάθε είδους δοχεία (Βογιατζόγλου – Σαμανίδου, 2011) από την άνοιξη έως τους πρώτους παγετούς (Schaffner et al., 2001) με αρκετές γενιές ανά έτος ανάλογα με τις κλιματικές συνθήκες (Becker et al., 2010).

Μετά την έξοδο από το νυμφικό περίβλημα και αφού παρέλθει χρονικό
[46]

διάστημα 2-9 ημέρες, το ενήλικο θηλυκό είναι ώριμο αναπαραγωγικά για σύζευξη. Η ποσότητα των σπερματοζωαρίων που λαμβάνει από μία σύζευξη αρκεί εφόρου ζωής, ενώ το αρσενικό μπορεί να συζευχθεί πολλές φορές στη διάρκεια της ζωής τους.

Μετά τη γονιμοποίηση το θηλυκό αναζητά ξενιστή για να λάβει γεύμα αίματος και να εξασφαλίσει τις απαραίτητες πρωτεΐνες ώστε να ολοκληρωθεί η ωογένεση (Βογιατζόγλου – Σαμανίδου, 2011). Το γεύμα αίματος των θηλυκών προέρχεται από ανθρώπους και ζώα και η προτίμησή του εξαρτάται από το είδος του κουνουπιού, δηλαδή μπορεί να είναι ανθρωπόφιλο, ζωόφιλο ή να παρουσιάζει ενδιάμεση συμπεριφορά. Αρκετές έρευνες διεξήχθησαν σχετικά με τη προτίμηση της διατροφής των θηλυκών του *Cx. pipiens* (Al-Rashidi et al., 2022; Chikwendu et al., 2019; Shehata, 2018) με διαφορετικές πηγές γεύματος αίματος (γουρούνι, πτηνό, κουνέλι και άνθρωπο) με σκοπό να αποσαφηνιστεί η σχέση των κουνουπιών στη μετάδοση μολυσματικών ιών (Gomes et al., 2013; Muñoz et al., 2012; Osório et al., 2012) φανερώνοντας την ορνιθοφιλική τάση του *Cx. pipiens* f. *pipiens* και την προτίμηση για τα θηλαστικά και τον άνθρωπο του *Cx. pipiens* f. *molestus* (Huang et al., 2009; Kilpatrick et al., 2007). Οι Abbo και συνεργάτες (2021) έδειξαν ότι ο βαθμός μόλυνσης και μετάδοσης του ιού USUV με γεύμα αίματος από άνθρωπο και κοτόπουλο από το *Cx. pipiens* f. *pipiens* και από το *Cx. pipiens* f. *molestus* επηρεάζονται από την προτίμηση των γευμάτων αίματος των κουνουπιών.

Τα υβρίδια των παραπάνω βιοτύπων φανερώνουν ευκαιριακή συμπεριφορά διατροφής που τείνει στο *Culex pipiens* f. *pipiens* (Gomes et al., 2013) ή κάπου ενδιάμεσα χωρίς να είναι σαφή τα αποτελέσματα (Fritz et al., 2015).

Η αυτογένεση (ωοτοκία χωρίς γεύμα αίματος) είναι υποχρεωτική ή προαιρετική ανάλογα με το είδος κουνουπιού και τις συνθήκες (Roubaud, 1929). Αρκετά είδη χρειάζονται γεύμα αίματος ώστε να αποθέσουν την πρώτη συστάδα ωών (Attardo et al., 2005) ενώ άλλα όπως το *Cx. pipiens* f. *molestus* αναπτύσσουν την πρώτη συστάδα ωών αυτογενώς, αλλά στη συνέχεια χρειάζονται γεύμα αίματος για τις επόμενες συστάδες ωών (Dobrotworsky and Drummond, 1953, Dobrotworsky, 1954; Kassim et al., 2012a; Kassim et al.,

2012b; Marshall, 1944). Άλλος παράγοντας που συντελεί στην διαφορά στην παραγωγή ωών αποδίδεται στη γενετική διαφορά από τη γεωγραφική απομόνωση καθώς και από τη διατροφή των προνυμφών. Η διατροφή των προνυμφών επηρεάζει το μέγεθος των σχεδίων ωών, καθώς και την έκφραση της αυτογένεσης (Clements 1992; Kassim et al. 2012 c,b; Lounibos et al. 1982).

Τα συζευγμένα θηλυκά διαχειμάζουν σε καταφύγια και τρέφονται σε θερμόαιμα σπονδυλωτά τη νύχτα, σε εσωτερικό ή εξωτερικό χώρο και αναπαύονται σε εσωτερικό χώρο για να πέμψουν το αίμα. Η επαναδραστηριοποίηση της διάπαυσης / διαχείμασης των θηλυκών συμβαίνει την άνοιξη όταν η θερμοκρασία και η φωτοπερίοδος αυξάνει (Ciota et al., 2011). Τα αρσενικά δεν διασπείρονται μακριά από την εστία αναπαραγωγής – συνήθως σε λιγότερο από 500 μέτρα (Becker et al., 2010). Στη φύση, τα θηλυκά είναι πιο άφθονα καθώς πετούν, στον αέρα, παρά στο έδαφος (Becker et al., 2010; L'Ambert et al., 2012).

Ο βιότοπος *Cx. pipiens* f. *pipiens* διαχειμάζει ως γονιμοποιημένο θηλυκό σε αναπαραγωγική διάπαυση σε προφυλαγμένες θέσεις (Mitchell & Briegel, 1989; Vinogradova, 2000; Vogels et. al., 2015). Η έκθεση από τις προνύμφες και τις νύμφες σε χαμηλές θερμοκρασίες και η σύντομη διάρκεια της ημέρας ευθύνονται για τις φυσιολογικές αλλαγές και την επαγωγή της διάπαυσης στα θηλυκά (Robich & Denlinger, 2005; Sim & Denlinger, 2013). Η μορφή *molestus* τον χειμώνα παραμένει ενεργή και αναπαράγεται.

Η διαρκής μεταβολή των συνθηκών του περιβάλλοντος επιφέρει σε όλα τα είδη κουνουπιών, όπως και στο *Cx. pipiens*, περιβαλλοντικές καταπονήσεις με κυριότερες να είναι οι ακραίες υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες καθώς και η αφυδάτωση.

Σε μελέτες για την αφυδάτωση (Benoit et al., 2010; Benoit and Denlinger, 2007; Gray and Bradley, 2005; Lee et al., 2009; Rinehart et al., 2006) αναφέρεται πως τα κουνούπια είναι υδρόφιλα. Το σώμα των ενήλικων θηλυκών αποτελείται σε ποσοστό 60-70% από νερό και μπορεί να χάσει περίπου το 25-35% μέχρι να αποβιώσουν (Benoit et al., 2010). Συνεπώς, για να μειώσουν την αφυδάτωση λαμβάνουν γεύμα αίματος ή νερού (Benoit et al., 2010; Gray and Bradley, 2005).

Η θερμοκρασία εγκλιματισμού μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις σε διάφορες παραμέτρους ανθεκτικότητας όπως η ανοχή στο κρύο και στη θερμότητα (Ayrinhac et al., 2004; Fischer et al., 2010; Gibert et al., 2001; Hoffmann et al., 2005; Overgaard et al., 2011). Επίσης, ο θερμικός εγκλιματισμός επηρεάζει τον μεταβολικό ρυθμό (Niehaus et al., 2012; Terblanche et al., 2005) καθώς και την ευαισθησία του μεταβολικού ρυθμού στη θερμοκρασία (Lachenicht et al., 2010). Δεδομένου ότι ο μεταβολικός ρυθμός αντιπροσωπεύει το ρυθμό των βιολογικών αντιδράσεων στο σώμα, η ευαισθησία στη θερμική διακύμανση μπορεί να έχει επιπτώσεις στη φυσική κατάσταση του οργανισμού. Επειδή το γένος *Culex* είναι κύριος φορέας του ΙΝΔ και άλλων ασθενειών (Hayes et al., 2005), η κατανόηση της απόκρισης των κουνουπιών στην κλιματική αλλαγή θα παρείχε πληροφορίες για την πρόβλεψη της κατανομής ασθενειών σε ανθρώπους και σε ζώα.

Έρευνες έδειξαν ότι τα θηλυκά του *Cx. pipiens* εξαντλούν 60 και 85% των αποθεμάτων λιπιδίων τους κατά τη διάρκεια της διαχείμασης (Buxton, 1935; Tekle, 1960; Onyeka & Boreham, 1987). Συνεπώς, τα θηλυκά για να επιβιώσουν, πρέπει να βρουν ένα ενδιαίτημα με συγκεκριμένη θερμοκρασία, όπως το ανώτερο στρώμα εδάφους με φύλλα (Sayer, 2006).

Σύμπλεγμα ειδών και η σημασία τους στην επιδημιολογία

Από τις αρχές του 20ου αιώνα, έχουν οργανωθεί εκστρατείες σε πολλές ευρωπαϊκές πόλεις για την αντιμετώπισή του *Cx. pipiens* (Schaffner, 2001) καθώς παρουσιάζει υψηλή οικολογική πλαστικότητα, η οποία δίνει μια σύνθετη εικόνα ως προς την τροφική συμπεριφορά και τη μετάδοση μολυσματικών ασθενειών.

Το *Cx. pipiens* (L.) διακρίνεται σε δύο βιοτύπους, στο *Cx. pipiens* f. *pipiens* και στο *Cx. pipiens* f. *molestus*, που παρουσιάζουν ουσιαστικές διαφορές στα συμπεριφορικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά, αλλά είναι μορφολογικά δυσδιάκριτοι (Vinogradova 2000). Ο όρος βιότυπος είναι μια υποειδική κατηγορία που αναφέρεται σε πληθυσμούς παρόμοιας γενετικής σύνθεσης με μια κοινή βιολογική ιδιότητα. Αναγνωρίζονται με βάση τις προτιμήσεις του ξενιστή για τη διατροφή, τη συμπεριφορά, τη γενετική σύνθεση,

τις φυσιολογικές αποκρίσεις σε αλλαγές και καταπονήσεις στο περιβάλλον (φως, θερμοκρασία, σχετική υγρασία, εντομοκτόνα και φυτά ξενιστές), τις αναπαραγωγικές αναλύσεις (γονιμότητα και γονιμότητα), τα πρότυπα ημερήσιας ή εποχιακής δραστηριότητας, τις τάσεις μετανάστευσης και διασποράς, τις διαφορές στη φερομόνη καθώς και για την ικανότητα του φορέα μετάδοσης ασθενειών (Eastop, 1973; Gonzales et al, 1979; Russel, 1978; Starks et al, 1983).

Η τρέχουσα επιστημονική αντίληψη εξετάζει την γονιδιακή ροή και τους αναπαραγωγικούς φραγμούς, συμπεριφορικούς ή κυτταρολογικούς που υπάρχουν μεταξύ των βιοτύπων. Έχουν τεκμηριωθεί μορφομετρικές παραλλαγές μεταξύ βιοτύπων εντόμων (Barrion, 1985; Fargo et al., 1986; Saxena and Rueda, 1982) που στην πλειονότητά τους αφορούν τη μετάδοση ιώσεων από έντομα σε ξενιστές (Maxwell, 1972). Οι βιότυποι αντιπροσωπεύουν τις εξελικτικές μορφές πληθυσμών εντόμων στην ειδογένεση. Επίσης, δεν αποκλείεται η ανάπτυξη βιοτύπων μέσω μετάλλαξης (Harris, 1975; Nielson and Don, 1974; Pathak, 1975) ή η εξάπλωσή τους μέσω της μετανάστευσης.

Πιο συγκεκριμένα, ο βιότυπος *Cx. pipiens* f. *pipiens* περιγράφεται ως αναυτογενής, ευρυγαμικός, ετεροδύναμος (διαπαυτικός) και κυρίως ορνιθοφίλος, ο βιότυπος *Cx. pipiens* f. *molestus* είναι στενογαμικός, αυτογενής, ανθρωπόφιλος, προτιμά υπόγεια υδάτινα σώματα με υψηλή οργανική περιεκτικότητα και δεν διαπαύει (Shaikovich et al., 2016). Ο *Cx. pipiens* f. *molestus* (Forsskal) αναπτύσσεται συχνά σε υπόγειους οικοτόπους, όπως υπονόμους ή υπόγειες σιδηροδρομικές σήραγγες, όπου η θερμοκρασία στην κοντινή επιφάνεια επηρεάζεται σαφώς από την εποχιακή αλλαγή της θερμοκρασίας πάνω από το έδαφος (Ohtani et al., 2015). Ωστόσο, η θερμοκρασία του νερού στα αποχετευτικά συστήματα και τις υπόγειες σήραγγες κυμαίνεται της τάξης των 2-3°C και οι θερμοκρασίες παραμένουν πάνω από 10°C ακόμη και κατά τη διάρκεια του χειμώνα (Byrne & Nichols 1999; Cipolla & Maglionico, 2014).

Συνεπώς, η βιολογία του κάθε βιότυπου επηρεάζει τα δημογραφικά του χαρακτηριστικά, την επιδημιολογία των ασθενειών καθώς και τα μέτρα πρόληψης και καταστολής τους. Θηλυκά του *Cx. pipiens* τρέφονται με ποικιλία σπονδυλωτών ξενιστών και συμβάλλουν στον κύκλο ενίσχυσης του ιού του

Δυτικού Νείλου (WNV) μεταξύ των πτηνών, καθώς και στην περιστασιακή διασπορά ιών σε πληθυσμούς ανθρώπων και άλλων θηλαστικών (Martinet et al., 2019; Muñoz et al., 2012; Rizzolli et al., 2015) καθιστώντας το *Cx. pipiens* κύριο φορέα τόσο του ιού του Δυτικού Νείλου όσο και του ιού Usutu (USUV) στην Ευρώπη. Το *Cx. pipiens* είναι επίσης σε θέση να μεταδώσει και αρκετούς άλλους αρμφοϊούς, ενώ λειτουργεί και ως φορέας της φιλαρίωσης (π.χ. διροφιλαρίαση σκύλων), δηλαδή πλασμώδια που προκαλούν ελονοσία στα πτηνά (Huijben et al., 2007; Martinet et al., 2019; Otranto et al., 2013).

1.4 Το ασιατικό κουνούπι τίγρης *Ae. albopictus*

1.4.1 Ταξινόμική θέση

Το *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) (Meigen, 1818) ανήκει στην τάξη των διπτέρων, στην υποτάξη Νηματόκερα, στην οικογένεια Culicidae, στην υποοικογένεια Culicinae και στο γένος *Aedes* (Azari-Hamidian et al., 2019). Αναφέρεται ως «Ασιατικό κουνούπι τίγρης» και αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα είδη του γένους εξαιτίας της επιδημιολογικής σημασίας καθώς και της γεωγραφικής εξάπλωσης (Invasive Species Specialist Group, 2009).

Το *Ae. albopictus* είναι είδος εισβολέα και αποτελεί σοβαρή απειλή για την δημόσια υγεία (Invasive Species Specialist Group, 2009). Ειδικότερα, μεταφέρει τον ιό του δάγκειου πυρετού (Effler et al., 2005, Ramchurn et al., 2009) τη διροφιλαρίαση (Aranda et al., 2006; Pampiglione et al., 2001), τον ιό Ζίκα (Grard et al., 2014; Wong et al., 2013) και θεωρείται ικανός φορέας τουλάχιστον 22 άλλων αρμφοϊών (Medlock et al., 2015; Schaffner et al., 2013).

Προέρχεται από τη Νοτιοανατολική Ασία, αλλά τα τελευταία 30-40 έτη εξαπλώθηκε στην Βόρεια, Νότια και Κεντρική Αμερική, στην βόρεια Αυστραλία, στην Αφρική και σχεδόν σε όλες τις χώρες της Ευρώπης (Paupy et al., 2009). Αυτό συνέβη μέσω της παθητικής μεταφοράς ωών με μεταχειρισμένα ελαστικά και με μπαμπού εσωτερικού χώρου (lucky bamboo - τυχερά μπαμπού), με το τελευταίο να είναι η οδός εισαγωγής στο Βέλγιο, στις Κάτω Χώρες και στην Καλιφόρνια (Demeulemeester et al., 2014; Madon et al., 2002; Schotle et al., 2008). Οι δημόσιες ή ιδιωτικές συγκοινωνίες από έντονα μολυσμένες περιοχές

έχουν μερίδιο στη παθητική μεταφορά του σε νέες περιοχές όπως είναι η εισαγωγή του στη νότια Γαλλία, στη Γερμανία, στα Βαλκάνια, στην Τσεχική Δημοκρατία, στην Ισπανία, στην Ιταλία και στην Ελβετία (Aranda et al., 2006; Kampen et al., 2013; Schotle et al., 2007; Sebesta et al., 2012).

Η αστικοποίηση αυξάνει το συγκριτικό πλεονέκτημα του *Ae. albopictus* σε σχέση με τα ιθαγενή κουνούπια καθώς εκμεταλλεύεται τεχνητές εστίες και εγκαθίσταται σε νέες περιοχές (Fischer et al., 2014). Οι χειμερινές και οι μέσες ετήσιες θερμοκρασίες επηρεάζουν την εξάπλωση του στην Ευρώπη (Roiz et al., 2011). Χάρτες που λαμβάνουν υπόψη τους την κλιματική αλλαγή δείχνουν επέκταση των ειδών στη Μεσόγειο και σε παράκτιες περιοχές της Ελλάδας, της Τουρκίας και στα Βαλκάνια (Caminade et al., 2012; Fischer et al., 2014).

Η εγκατάσταση του *Ae. albopictus* επιβεβαιώθηκε στην Ελλάδα το 2003 (Samanidou-Voyadjoglou et al., 2005) στη Θεσπρωτία και στην Κέρκυρα (βορειοδυτική Ελλάδα) ενώ το 2007 βρέθηκε στις Περιφερειακές Ενότητες Αιτωλοακαρνανίας και Λευκάδας (Δυτική Ελλάδα). Έκτοτε, είχε αργή διασπορά έως το 2010 και στη συνέχεια γρηγορότερη (Περιφέρειες Κεντρικής Μακεδονίας, Πελοποννήσου και Αττικής) καθώς μέχρι το 2016 εντοπίστηκε σε όλη την Ελλάδα εκτός από ορισμένες περιοχές στη βόρεια Ελλάδα και στα νησιά του Αιγαίου. Οι Giatropoulos και συνεργάτες (2012a) μελέτησαν την κατανομή και την πληθυσμιακή του αφθονία στην Αθήνα, μετά την πρώτη ανίχνευση το 2008, με δείγματα (Giatropoulos et al., 2012b) από πολίτες, από εταιρείες καταπολέμησης και από αρχές δημόσιας υγείας. Το 2018 εξαπλώθηκε και σε νέες περιοχές της Περιφέρειας Αττικής (Badieritakis et al., 2018).

Οι Patsoula και συν. (2017) ανέφεραν την ύπαρξή του στην Περιφερειακή Ενότητα Βορείου Αιγαίου (νήσος Λέσβος), στην Περιφερειακή Ενότητα Κρήτης (Χανιά - 2014) και στις τρεις Περιφερειακές Ενότητες Ανατολικής Μακεδονίας-Θράκης (Ροδόπη, Ξάνθη και Δράμα). Στη μελέτη των Badieritakis και συν. (2018) καταγράφηκε για πρώτη φορά και στις υπόλοιπες τρεις Περιφερειακές Ενότητες Κρήτης (στο Ρέθυμνο το 2016, στο Ηράκλειο το 2015 και στον Άγιο Νικόλαο), στην Περιφερειακή Ενότητα Ρόδου (νότιο Αιγαίο) και στην Περιφερειακή Ενότητα Καβάλας (Ανατολική Μακεδονία-Θράκη).

1.4.2 Βιολογία του *Ae. albopictus*

Το *Ae. albopictus* είναι πολυκυκλικό είδος το οποίο έχει 5-17 γενιές ανά έτος (Gatt et al., 2009). Τα ωά εναποτίθενται στην προτιμότερη εστία αναπαραγωγής και η εκκόλαψη διαρκεί μεταξύ 2-7 ημέρες. Το σχήμα τους είναι ατρακτοειδές, έχουν λεπτά άκρα, διογκωμένο κέντρο με στρογγυλεμένα και μεγάλα φυμάτια. Εναποτίθενται σε φυσικές ή τεχνητές δεξαμενές και εκκολάπτονται όταν τα επίπεδα νερού τους πλημμυρίζουν. Η εκκόλαψη γίνεται σε νερό με χαμηλή διαύγεια και PH από 5,2 έως 7,6 (βέλτιστο εύρος 6,8 έως 7,6) με υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικό άζωτο. Οι προνύμφες είναι σκουρόχρωμες (Estrada - Franco et al., 1995). Στην Ευρώπη, προτιμά τα αστικά και τα προαστιακά ενδιαιτήματα (Juliano et al., 2005).

Τα ενήλικα έχουν ακτίνα πτήσης 200 μέτρα (Turell et al., 2005). Χαρακτηριστικό είναι το άσπρο και μαύρο μοτίβο στο σώμα του *Ae. albopictus* ενώ υπάρχει διαφοροποίηση με το *Ae. cretinus* στα μοτίβο του θώρακα (Eritja et al., 2005). Τα ενήλικα συζευγνύονται δύο ή τρεις ημέρες μετά την ενηλικίωση, έως και τέσσερις φορές κατά την διάρκεια της ζωής με διάρκεια από 5 έως 15 δευτερόλεπτα. Τα θηλυκά ωοτοκούν 45 έως 200 ωά και η μακροβιότητα στο εργαστήριο φτάνει έως και τις 117 ημέρες ενώ στη φύση σε εύκρατο κλίμα και υψηλή υγρασία που κυμαίνεται μεταξύ 30 και 40 ημερών (Estrada - Franco et al., 1995).

Το *Ae. albopictus* τρέφεται (Turell et al., 2005) σε ανθρώπους, οικιακά και άγρια ζώα, ερπετά και αμφίβια (Eritja et al., 2005). Η ανάλυση γεύματος αίματος έδειξε προτίμηση σε ανθρώπινο αίμα (Paupy et al., 2009). Έρευνα στην Ιταλία έδειξε πως υπάρχει προτίμηση στα θηλαστικά σε αντίθεση με τα πουλιά, με το ανθρώπινο γεύμα αίματος να συναντάται πιο συχνά σε αστικές και ημιαστικές περιοχές (Valerio et al., 2010).

Όταν πραγματοποιήθηκαν πειράματα γεύματος αίματος στο εργαστήριο καθώς και σε φυσικές και ημιφυσικές συνθήκες, δημιουργήθηκαν πίνακες επιβίωσης και μελετήθηκε ο περιβαλλοντικός αντίκτυπος στα δημογραφικά χαρακτηριστικά των κουνουπιών (Grech et al., 2015; Li et al., 2014). Βρέθηκε πως οι περιβαλλοντικές συνθήκες επηρεάζουν την ανάπτυξη των προνυμφών και τον αριθμό, την επιβίωση και το αναπαραγωγικό δυναμικό (Afrane et al.,

2007; Afrane et al., 2008; Alam et al., 2019; Dieng et al., 2010; Preechaporn et al., 2006; Yang et al., 2020) καθώς και τη γονιμότητα των ενηλίκων (Leinsham, 2014; Suman et al., 2011).

Η γενετική ποικιλομορφία του *Ae. albopictus* (Bergsten et al., 2012; Battaglia et al., 2016; Duong et al., 2021; Kotsakiozi et al., 2017; Ruiling et al., 2018) αποκαλύπτει διαφορές στη γονιδιακή έκφραση και συνακόλουθα στη διάπαυση και στη μη διάπαυση (Batz & Armbruster, 2018; Sota & Mogi, 1992) που σχετίζονται με την επιβίωση και την ανθεκτικότητα στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις. Οι πληθυσμοί τροπικών και υποτροπικών περιοχών είναι ενεργοί όλο το έτος χωρίς διάπαυση (Gatt et al., 2009) ενώ εκείνοι στις εύκρατες περιοχές επηρεάζονται από την θερμοκρασία και τη φωτοπεριοδικότητα και προκειμένου να επιβιώσουν διαχειμάζουν ως διαπαύοντα ωά (13 – 14 ώρες φωτός/ημέρα) (Medlock et al., 2006).

Το *Ae. albopictus* μπορεί να αναπτυχθεί και να επιβιώσει σε θερμοκρασίες από 10,4 °C έως 29,7 °C (Delatte et al., 2009). Η δραστηριότητα των ενηλίκων είναι περιορισμένη κάτω από τους 9°C (Roiz et al., 2010), ενώ στην Ιταλία πληθυσμοί δείχνουν προσαρμογή στο κρύο και παραμένουν ενεργοί κατά τον χειμώνα (Romi et al., 2006). Τα διαπαύοντα ωά επιβιώνουν σε θερμοκρασίες μέχρι -10°C, ενώ τα μη διαπαύοντα μέχρι τους -2°C με αυξημένη επιτυχία εκκόλαψης σε ωά που διαπαύουν σε σύγκριση με εκείνα που δεν διαπαύουν (Thomas et al., 2012).

Στην Ελλάδα οι κλιματικές συνθήκες επιτρέπουν το *Ae. albopictus* να είναι ενεργό για περισσότερους από οκτώ μήνες το χρόνο με αφθονία το καλοκαίρι και κορύφωση τον Οκτώβριο. Η ωοτοκία συμβαίνει από τα μέσα Απριλίου έως τον Δεκέμβριο, με υψηλότερο αριθμό ωών από τα μέσα Ιουλίου έως το τέλος του φθινοπώρου και σημαντικά αυξημένο κατά τη διάρκεια ήπιου και βροχερού καιρού (Giatropoulos et al., 2012).

Οι Kobayashi και συν. (2002) έδειξαν σημαντική συσχέτιση μεταξύ της μέσης ετήσιας θερμοκρασίας και της πυκνότητας του *Ae. albopictus* και εκτίμησαν πως η υπερθέρμανση του πλανήτη θα του επιτρέψει να επεκταθεί βορειότερα. Οι Mogi και Tuno (2014) έδειξαν ότι υψηλότερες θερμοκρασίες το χειμώνα είναι ένας σημαντικός παράγοντας που οδηγεί στην εξάπλωση του *Ae.*

albopictus. Τέλος, σύμφωνα με τους Rochlin και συν. (2013) θα αυξηθούν κατά 50% μέχρι το τέλος του αιώνα οι περιοχές με κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες για την ανάπτυξη του *Ae. albopictus* θέτοντας σε κίνδυνο άλλα 30 εκατομμύρια ανθρώπους.

Σχετικά με το *Ae. albopictus* έχει επεκταθεί παγκόσμια, γεγονός που διευκολύνθηκε από τις ανθρώπινες δραστηριότητες παθητικά μέσω δημόσιων και ιδιωτικών συγκοινωνιών, ιδίως από τη μεταφορά ελαστικών και φυτών μπαμπού «τυχερό μπαμπού» (Paupy et al., 2009). Το *Ae. albopictus* αποτελεί κρυπτικό ή αδελφό είδος (sibling species) με το *Ae. aegypti*, ομοίως είδος – εισβολέα το οποίο έχει οικολογική πλαστικότητα και έχει μετακινηθεί από ήπειρο σε ήπειρο μέσω πλοίων και προηγουμένως είχε εγκατασταθεί στη νότια Ευρώπη από τα τέλη του 18ου έως τα μέσα του 20ού αιώνα.

Η πλαστικότητα του *Ae. albopictus* σε νέα περιβάλλοντα αυξάνει τη σημαντικότητα της μελέτης της δημογραφίας του παρέχοντας χρήσιμα επιδημιολογικά στοιχεία των ασθενειών που μπορεί να μεταδώσει όπως ο ιός Ζίκα, ο Chikungunya και ο δάγγειος και ο κίτρινος πυρετός.

1.5 Αντιμετώπιση των κουνουπιών

Η πρόληψη των ασθενειών που μεταδίδονται από τα κουνούπια βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στην καταπολέμηση των διαβιβαστών τους (Wilson et al., 2020). Η διαχείρισή τους γίνεται με οργανωμένη αξιολόγηση κινδύνου και με προκαθορισμένα σχέδια δράσης που το σημαντικότερο κομμάτι τους είναι η μελέτη των δημογραφικών τους χαρακτηριστικών.

Σύμφωνα με το εγχειρίδιο του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) για την ολοκληρωμένη διαχείριση φορέων ασθενειών (Integrated vector Management-IVM) πρέπει να ληφθεί υπόψη το είδος-στόχος, η οικολογία του και οι επιπτώσεις του στη δημόσια υγεία, δηλαδή στην ενόχληση και στη μετάδοση ασθενειών. Σημαντική είναι και η συμμετοχή των τοπικών αρχών, των ιδιωτικών εταίρων και της κοινωνίας (Baldacchino et al., 2015) με τη χρήση μεθόδων καταπολέμησης όπως περιβαλλοντικές, μηχανικές, βιολογικές, χημικές και γενετικού ελέγχου (WHO, 2012). Στις μέρες μας

ξαναχρησιμοποιούνται και νέα εργαλεία που είναι φιλικά προς το περιβάλλον και συμβάλουν στην αποτελεσματική καταπολέμησή τους όπως είναι η τεχνική των στειρωμένων εντόμων (SIT).

1.5.1 Διαχείριση των εστιών αναπαραγωγής

Ένας αποτελεσματικός τρόπος για την αντιμετώπιση των κουνουπιών είναι η εύρεση και η εξάλειψη των εστιών αναπαραγωγής όπως είναι βάλτοι ή αργά κινούμενα ρέματα ή τάφροι γεγονός που απαιτεί διαρκή και συντονισμένη προσπάθεια. Οι προνύμφες των κουνουπιών χρησιμοποιούν και τεχνητά ενδιαιτήματα και αναπτύσσονται σε παλιά ελαστικά, πισίνες, πιάτα από τις γλάστρες, στέρνες, δεξαμενές ή άλλα δοχεία που συγκρατούν νερό τα οποία πρέπει να αποστραγγίζονται και να σφραγίζονται ώστε να μην συγκρατούν στάσιμο νερό (Service, 2012).

Η χαρτογράφηση της περιοχής καθώς και η χρήση δεδομένων μέσω δορυφόρου διευκολύνει τον εντοπισμό των εστιών (Petric et al., 2014) χωρίς να βοηθά αποτελεσματικά στον εντοπισμό κρυπτικών τόπων αναπαραγωγής, όπως φυσικές δεξαμενές (απορρίμματα φύλλων) και τεχνητά δοχεία (σκουπίδια) (Jacups et al., 2013). Αποτελεσματική μείωση των εστιών επιτυγχάνεται με το σχολαστικό και επαναλαμβανόμενο καθαρισμό που έγκειται στην ιδιωτική πρωτοβουλία (Unlu et al., 2013). Ωστόσο, η συγκεκριμένη προσέγγιση μπορεί να επηρεάσει και την κατανομή άλλων ειδών κουνουπιών περιορίζοντας τις διαθέσιμες τοποθεσίες ωτοκίας (Fonseca et al., 2013). Πιο συγκεκριμένα, σε προάστιο της Ουάσιγκτον η μείωση του αριθμού των δοχείων συγκράτησης νερού για την αντιμετώπιση του *Cx. pipiens* επηρέασαν και τον πληθυσμό του *Ae. albopictus*, καθώς έχει εστίες ανάπτυξης κρυπτικού τύπου (Dowling et al., 2013).

1.5.2 Μαζική παγίδευση και θανάτωση

Η μαζική παγίδευση με χρήση δολωμάτων οσμής έχει προταθεί ως μέσο μείωσης των πληθυσμών ενήλικων κουνουπιών (Kline, 2007). Μελέτες έχουν δείξει ότι οι παγίδες BGs, ειδικά με πηγή CO₂, είναι αποτελεσματικές για το *Aedes* sp. (Farajollahi et al., 2009; De Azara et al., 2013) ενώ για το *Culex* sp.

χρησιμοποιούνται διάφοροι τύποι παγίδων.

Άλλο διαδεδομένο μέσο αντιμετώπισης είναι η χρήση παγίδων ωτοκίας. Οι παγίδες ωτοκίας στοχεύουν σε συζευγμένα θηλυκά και εκμεταλλεύονται την τάση των κουνουπιών να ωτοκοούν σε μικρές (Gibson - Corrado et al., 2017) τεχνητές συλλογές νερού. Οι τεχνητές τοποθεσίες ωτοκίας μπορούν να μετατραπούν σε θανατηφόρες ωτοπαγίδες (Leathal onitraps - LOT) (Mackay et al., 2013) με την προσθήκη ενός εντομοκτόνου συστατικού (χημικού ή βιολογικού) (Velo et al., 2016). Οι παγίδες αυτές είναι χαμηλού κόστους και έχει αποδειχθεί (υπό ορισμένες προϋποθέσεις) ότι η χρήση τους μειώνει την πυκνότητα του πληθυσμού των κουνουπιών σε προγράμματα μεγάλης κλίμακας (Baldacchino et al., 2015). Η αποτελεσματικότητα των LOT μπορεί να αυξηθεί όταν εμπλουτιστεί με οργανικά υπολείμματα όπως γρασίδι, σανός ή δρυς, καθώς και λιπάσματα NPK (άζωτο-φώσφορο-κάλιο), για να βελτιωθεί η ελκυστικότητά τους (Darriet, 2018; Santana et al., 2006).

1.5.3 Βιολογική αντιμετώπιση κουνουπιών

Η βιολογική καταπολέμηση μειώνει τον πληθυσμό στόχο με αρπακτικά, παθογόνα, ανταγωνιστές και τοξίνες από μικροοργανισμούς (Woodring & Davidson, 1996) και επιτυγχάνεται είτε με εμβολιασμό "inoculative" ή είτε με μαζική εξαπόλυση "inundative" του παράγοντα βιολογικής καταπολέμησης.

Σύνηθες μέτρο για την καταπολέμηση των κουνουπιών αποτελεί η εξαπόλυση κουνουποφάγων ψαριών (Larvivorous fish) σε πλημμυρισμένους ορυζώνες (Walton, 2007). Η μαζική απελευθέρωση αρπακτικών, παρασίτων, παθογόνων ή των τοξινών τους επιδρά άμεσα στον πληθυσμό - στόχο. Οι άρπαγες διακρίνονται στους σπονδυλωτούς όπως ψάρια, αμφίβια, πουλιά και νυχτερίδες και στους ασπόνδυλους όπως ύδρα, σκουλίκια, αράχνες, τερμίτες, μαλακόστρακα αλλά και έντομα όπως οδοντόγναθα και αρπακτικά δίπτερα (Becker et al., 2010).

Φυσικούς εχθρούς των κουνουπιών αποτελούν και τα παράσιτα όπως νηματώδεις, παθογόνα, μύκητες, πρωτόζωα και βακτήρια. Βακτήρια (π.χ. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (= *B. thuringiensis* ορότυπος H-14) και *B. sphaericus*), ιοί (π.χ. *cytoplasmic polyhedrosis* viruses), πρωτόζωα (π.χ. *Bracheola algerae* και *Vavraia culicis*), μύκητες (π.χ. είδη *Coelomomyces*,

Lagenidium και *Culicinomyces*) προκαλούν θνησιμότητα στις προνύμφες των κουνουπιών. Παρασιτικοί νηματώδεις σκοτώνουν προνύμφες κουνουπιών, με πιο γνωστό το *Romanomermis culicivorax* (Service, 2012).

Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες όπως ο *Beauveria bassiana* και ο *Metarhizium anisopliae* αποτελούν μία πολλά υποσχόμενη μέθοδο (Darbro et al., 2012) ενώ τα κυκλοποειδή κωπήποδα αποδείχθηκαν τα πιο αποτελεσματικά ασπόνδυλα αρπακτικά των προνυμφών κουνουπιών. Η μαζική παραγωγή τους είναι σχετικά εύκολη και ανέξοδη (Marten & Reid, 2007).

Το μικροβιακό προνυμφοκτόνο *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) χρησιμοποιείται εκτενώς για την καταπολέμηση διαφόρων ειδών κουνουπιών (Guidi et al., 2013). Το *Bti* μπορεί να συσχετιστεί με ένα άλλο μικροβιακό προνυμφοκτόνο, το *Lysinibacillus sphaericus* (*Lsph*), γνωστό ως *Bacillus sphaericus*. Στην Ευρώπη, το *Bti* χρησιμοποιείται για την επιλεκτική καταπολέμηση των προνυμφών σε ενδιαιτήματα που πλημμυρίζουν καθώς και σε παράκτιους υγρότοπους (Montarsi et al., 2013). Το *Bti* έχει υπολειμματική δράση, ειδικά σε μολυσμένο ή οργανικά εμπλουτισμένο νερό, ενώ το *Lsph* δρα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Το *Lsph* είναι κυρίως ενεργό στο *Culex* sp. και λιγότερο σε άλλα είδη κουνουπιών. Το *Bti* μόνο του ή σε συνδυασμό με το *Lsph* είναι αποτελεσματικό για την ολοκληρωμένη καταπολέμηση κουνουπιών (Anderson et al., 2011; Tan et al., 2012) αλλά υπάρχει αναφορά ανθεκτικότητας (33 φορές) *Bti* σε πληθυσμό *Cx. pipiens* (Paul et al., 2005).

Το Spinosad, το οποίο δεν έχει άδεια χρήσης για την ΕΕ είναι προνυμφοκτόνο και προέρχεται από τη ζύμωση ενός ακτινομύκητα του εδάφους, του *Saccharopolyspora spinosa* και έχει δράση σε όλα τα είδη κουνουπιών (Hertlein et al., 2010). Στο Μεξικό, σε ελαστικά αυτοκινήτων το spinosad παρείχε 6-8 εβδομάδες αποτελεσματικής καταπολέμησης προνυμφών του *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* και *Culex* sp. (Marina et al., 2011).

Βιολογικός τρόπος καταπολέμησης των κουνουπιών αποτελούν και τα αιθέρια έλαια που περιλαμβάνουν ένα σύνθετο μείγμα συστατικών όπως μονοτερπένια, φαινόλες και σесκιτερπένια, τα οποία θα μπορούσαν να δράσουν συνεργιστικά και είναι πιο δραστικά από μεμονωμένες ενώσεις. Μείγματα αιθέριων ελαίων με *Bti* (Giatropoulos et al., 2022) παρατηρήθηκε ότι

είναι πιο δραστικά έναντι των προνυμφών του *Ae. albopictus* παρά μόνο *Bti* (Chang et al., 2014).

1.5.4 Χημική αντιμετώπιση κουνουπιών

Η χημική καταπολέμηση βασίζεται στην εφαρμογή προνυμφοκτόνων ανάλογα με το μέγεθος και τον τύπο της εστίας αναπαραγωγής (Becker et al., 2010). Παρά την ανάπτυξη μη χημικών μεθόδων (Flores & O'Neill, 2018) τα εντομοκτόνα λόγω της ευκολίας χρήσης τους και της αποτελεσματικότητάς τους χρησιμοποιούνται ευρέως αφού στοχεύουν κυρίως στα ανήλικα στάδια (προνύμφες και νύμφες). Με πρότυπο το IRAC (Insecticide Resistance Action Committee) γίνεται διάκριση των εντομοκτόνων σε 28 ομάδες όπως οργαλοχλωριωμένα, οργανοφωσφορικά, καρβαμιδικά, χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες, πυρεθροειδή, ρυθμιστές ανάπτυξης και συνεργιστικές ουσίες (Becker et al., 2010). Αυξημένη είναι η ανθεκτικότητα των κουνουπιών στα εντομοκτόνα καθώς έχει καταγραφεί σε 60 χώρες (WHO 2012; 2013).

Οι ρυθμιστές ανάπτυξης εντόμων (Insect Growth Regulators – IGRs) όπως το pyriproxyfen, το methoprene και το diflubenzuron χρησιμοποιούνται ως προνυμφοκτόνα άμεσης εφαρμογής, επίσης διαθέτουν ωκτόνο δράση με αναστολή της εκκόλαψης των ωών (Suman et al., 2013) και είναι ασφαλή για οργανισμούς μη στόχους (Mulla, 1995). Χρησιμοποιούνται ευρέως σε προγράμματα ολοκληρωμένης καταπολέμησης κουνουπιών (Caputo et al., 2015; Fonseca et al., 2013) και είναι πιο αποτελεσματικά στις εστίες αναπαραγωγής (Ocampo et al., 2014). Στην Κολομβία, η μηνιαία εφαρμογή του pyriproxyfen σε όλες τις εστίες αναπαραγωγής οδήγησε σε μείωση του πληθυσμού των προνυμφών του *Ae. aegypti* και σε μείωση του δάγκειου πυρετού (Ocampo et al., 2014). Επίσης, η χρήση του diflubenzuron αναστέλλει τη μεταμόρφωση του *Ae. albopictus* και του *Cx. pipiens* σε ενήλικο (Caputo et al., 2015).

Τα πειράματα βιοδοκιμών έχουν καταγράψει ανθεκτικότητα σε πολλά εντομοκτόνα, συμπεριλαμβανομένων των πυρεθροειδών, DDT, temephos κυρίως σε αγροτικούς και αστικούς πληθυσμούς της κεντρικής και νότιας Ασίας (π.χ. από την Κίνα, την Ταϊλάνδη, τη Σιγκαπούρη και την Ινδία), ενώ έχουν

αναφερθεί μόνο σποραδικές περιπτώσεις στην Ευρώπη, την Αμερική και τη δυτική Αφρική (Moyes et al., 2017).

Ένα από τα πιο επιτυχημένα παραδείγματα στρατηγικών αντιμετώπισης κουνουπιών είναι ο δολωματικός ψεκασμός (Dormont et al., 2021; Wooding et al., 2020) που συνδυάζει ελκυστικά όπως φερομόνες φύλου, τροφή, οσμές εστιών αναπαραγωγής με φυσικά/συνθετικά εντομοκτόνα. Τα σημειοχημικά προσεκλίνουν αποτελεσματικά ένα συγκεκριμένο έντομο σε παγίδες ή τοξικές επιφάνειες ή προκαλούν αύξηση της βρώσης και της κατάποσης του τοξικού δολώματος (Traore et al., 2020).

Ένας άλλος τρόπος αντιμετώπισης των ενηλίκων κουνουπιών είναι τα ελκυστικά τοξικά δολώματα ζάχαρης (Attractive targeted Sugar baits - ATSBs) είναι μια μέθοδος καταπολέμησης που εκμεταλλεύεται τη διατροφή του κουνουπιού (Müller et al., 2010; Qualls et al., 2010). Τα θηλυκά και τα αρσενικά λαμβάνουν την απαραίτητη ζάχαρη στη διατροφή τους από το νέκταρ λουλουδιών. Τα ATSB αποτελούνται από ένα διάλυμα που περιέχει ζάχαρη και χυμό φρούτων αναμειγμένο με τοξίνη (π.χ. βορικό οξύ, ευγενόλη) ή εντομοκτόνο (π.χ. dinotefuran, spinosad) (Fultcher et al., 2014). Στη Φλόριντα, η εφαρμογή του ATSB στη βλάστηση είχε ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση του *Ae. albopictus* ακόμη και 21 ημέρες μετά την εφαρμογή (Revay et al., 2014; Naranjo et al., 2013). Ο αρνητικός αντίκτυπος στα έντομα που δεν ήταν στόχοι ήταν χαμηλότερος όταν το δόλωμα ψεκάστηκε σε μη ανθισμένη βλάστηση (Revay et al., 2014).

Μια πιθανή προσέγγιση καταπολέμησης θα μπορούσε να βασίζεται σε υποστρώματα ή συσκευές με ικανότητα αναπαραγωγής ή μίμησης φυσικών χαρακτηριστικών του οικοτόπου (φυσικοχημικά, μορφολογικά, μηχανικά) και έτσι επηρεάζουν την έλξη των ειδών στόχων.

Ταυτόχρονα, είναι εφικτή η ενσωμάτωση ενός φυσικού βιοεντομοκτόνου (π.χ. βακτήρια, μύκητες) μέσα στα βιομιμητικά υποστρώματα και αυτή η προσέγγιση μπορεί να ονομαστεί «βιομιμητική». Σκοπός είναι ο εντοπισμός των βασικών περιβαλλοντικών χαρακτηριστικών και η δημιουργία τεχνητού περιβάλλοντος (βιομιμητικό τεχνητό περιβάλλον), το οποίο είναι συμβατό με τις συνθήκες επιβίωσης και ανάπτυξης του θανατηφόρου παράγοντα που μπορεί

να εκτελέσει τη μηχανική δράση. Αν και οι παραπάνω μέθοδοι είναι φιλικές προς το περιβάλλον και τους ανθρώπους καθώς οι αρχές τους βασίζονται στην βιολογική αντιμετώπιση δεν χρησιμοποιούνται συχνά, παρά μόνο σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους αντιμετώπισης κουνουπιών.

Για την καταπολέμηση των ενηλίκων κουνουπιών χρησιμοποιούνται τα αερολύματα και νέφη και η χρήση του υπέρμικρου όγκου (Ultra Low Volume – UVL) καθώς αποτελούν την πιο διαδεδομένη μέθοδο για την αντιμετώπιση της ελονοσίας σε Ασία, Ευρώπη και Λατινική Αμερική. Κουνούπια - φορείς της ελονοσίας παραμένουν στα σπίτια πριν και/ή μετά από τη διατροφή και συνεπώς χρησιμοποιείται εντομοκτόνο για ψεκασμό των σπιτιών. Αερολύματα χρησιμοποιήθηκαν για τους διαβιβαστές του δάγκειου πυρετού στον Μαυρίκιο τον Ιούνιο του 2009 (Ramchurn et al., 2009). Τα πυρεθροειδή χρησιμοποιούνται κυρίως κατά των ενηλίκων κουνουπιών λόγω της σχετικής ασφάλειάς τους για τον άνθρωπο, της υψηλής εντομοκτόνου δράσης τους σε χαμηλές δόσεις και της ταχείας αποδέσμευσής τους. Ωστόσο, είναι τοξικά για τα είδη - μη στόχους, τα υδρόβια ασπόνδυλα και τα ψάρια (Bonds, 2012). Στην Ευρώπη, οι εφαρμογές εδάφους στοχεύουν στη μείωση της όχλησης από τα κουνούπια, ενώ η εναέρια εφαρμογή απαγορεύεται εκτός από έκτακτη ανάγκη δημόσιας υγείας (Bellini et al., 2014; Chaskoroulou et al., 2011b). Επί του παρόντος, μόνο η Ουγγαρία επιτρέπει την εναέρια εφαρμογή εντομοκτόνων. Οι ψεκασμοί εδάφους εφαρμόζονται κυρίως ως θερμικά νέφη εκνέφωσης ή κρύα νέφη, σε υψηλή ένταση (HV; $>150 \text{ L h}^{-1}$), χαμηλό όγκο (LV; $18\text{--}60 \text{ L h}^{-1}$) ή εξαιρετικά χαμηλό όγκο (ULV; $0,6\text{--}18 \text{ L h}^{-1}$), με δημιουργία ομίχλης (Bellini et al., 2014).

Στην Ισπανία, οι Abramides και συν. (2011) παρατήρησαν ότι η εκνέφωση με α -cypermethrin σε δημόσια πάρκα στο πλαίσιο ολοκληρωμένης εκστρατείας ελέγχου ήταν αποτελεσματικό μέτρο στην αντιμετώπιση του *Ae. albopictus*, ενώ οι Bengoa και συν. (2014) διαπίστωσαν ότι σκεύασμα με deltamethrin (που εφαρμόστηκε στο ULV) παρουσίασε υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας έναντι του *Ae. albopictus*.

Η αποτελεσματικότητα των ψεκασμών επηρεάζεται κυρίως από το μέγεθος σταγονιδίων και του ρυθμού ροής, τις μετεωρολογικές συνθήκες, τον τύπο του οικοτόπου και τον χρόνο εφαρμογής (δραστηριότητα πτήσης των ειδών-στόχων) (Bonds, 2012; Harburguer et al., 2012). Αν και οι εφαρμογές

ψεκασμού, ιδιαίτερα στο ULV, έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε ολοκληρωμένες εκστρατείες καταπολέμησης (Integrated Management Strategies – IMS) κατά των κουνουπιών του γένους *Aedes* (Abramides, 2011; Fonseca et al., 2013) η μέθοδος είναι συζητήσιμη λόγω του υψηλού κόστους, της αργής λειτουργικής απόκρισης, της χαμηλής αποδοχής από την κοινότητα, του αναποτελεσματικού χρόνου εφαρμογής και του δυνητικού αντίκτυπου σε είδη μη στόχους (Bonds, 2012; Corbel et al., 2013; Esu et al., 2010).

Μια νέα προσέγγιση, γνωστή ως αυτοδιάδοση, προτείνεται για την καταπολέμηση των ενήλικων κουνουπιών με τη χρήση εντομοκτόνων (Devine et al., 2009). Τα ενήλικα θηλυκά κουνούπια «μολύνονται» από εντομοκτόνο ουσία που βρίσκεται σε δίκτυα ή σταθμούς αυτοδιάδοσης που κατασκευάζονται από τροποποιημένες παγίδες ωοτοκίας. Η αυτοδιάδοση του εντομοκτόνου συμβαίνει με τη μορφή μικροσκοπικών σωματιδίων που μεταφέρονται στους χώρους αναπαραγωγής (Devine et al., 2009; Itoh, 1994) και συμβάλει στην αντιμετώπιση των κουνουπιών στα ανήλικα στάδια. Η συγκεκριμένη μέθοδος (χρησιμοποιώντας το pyriproxyfen ως δραστική) αρχικά χρησιμοποιήθηκε για να ανήλικα στάδια και αποδείχτηκε ότι προκαλεί υψηλή θνησιμότητα στο *Ae. aegypti* και στο *Ae. albopictus* στο στάδιο της νύμφης σε μικρής κλίμακας πειράματα πεδίου που πραγματοποιήθηκαν στο Περού (Devine et al., 2009) και στην Ιταλία (Caputo et al., 2012). Επιπλέον, παρατηρήθηκε επίδραση στην ωοτοκία και την εκκόλαψη των ωών σε ημιφυσικές συνθήκες (Ohba et al., 2013). Οι Snetselaar και συν. (2014) σχεδίασαν επίσης μια νέα συσκευή επιμόλυνσης με συνδυασμό πυριπροξυφαίνης και του εντομοπαθογόνου μύκητα *B. bassiana*. Η διάδοση του pyriproxyfen είχε πάνω από 90% θνησιμότητα των προνυμφών και της *B. bassiana* αύξησε τη θνησιμότητα των ενηλίκων σε σύγκριση με εργαστηριακές συνθήκες. Ωστόσο, οι εφαρμογές του συμβατικού σκευάσματος πυριπροξυφαίνης σε ελαστικά ή σε βλάστηση δεν ήταν αποτελεσματικές και επηρεάστηκαν από κλιματικές συνθήκες όπως οι υψηλές βροχοπτώσεις (Suman et al., 2014). Η τεχνική της αυτοδιάδοσης μπορεί να βελτιωθεί με το σχεδιασμό νέων σταθμών μόλυνσης ή με την ανάπτυξη ειδικών σκευασμάτων πυριπροξυφαίνης. Μια άλλη προσέγγιση των Bouyer και Lefrançois (2014) είναι ο συνδυασμός της αυτοδιάδοσης με την τεχνική στείρων εντόμων (SIT) με την εξαπόλυση στειρωμένων αρσενικών

επικαλυμμένα με rygiproxyfen προκειμένου να μολύνουν τα θηλυκά κατά τη σύζευξη ώστε να ενισχυθεί η αποτελεσματικότητα της SIT.

1.5.5. Τεχνική Στερωμένων Εντόμων (Sterile Insect Technique – SIT)

Η τεχνική των στερωμένων εντόμων (SIT) αποτελεί μέθοδο διαχείρισης επιβλαβών εντόμων εξειδικευμένη ανά είδος, περιβαλλοντικά αειφόρος που στηρίζεται στην απελευθέρωση μεγάλου αριθμού στερωμένων αρσενικών (Dyck et al., 2005a; Knipling, 1955; 1979; 1998; Krafur, 1998). Παρουσιάζει επιτυχή αποτελέσματα όχι μόνο σε έντομα γεωργικής σημασίας (Bourtzis et al. 2016; Dyck et al., 2005a) αλλά και σε κουνούπια (Benedict & Robinson et al., 2003; Lofgen et al., 1974).

Η SIT χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1954 για το New World screwworm fly (Wyss, 2000), για το *Cochliomyia hominivorax* Coquerel (Klassen & Curtis, 2005, FAO, 2019; Lindquist et al., 1992) για τη μύγα *Bactrocera tryoni* Froggatt (Sproule et al., 1992) και για τη μύγα της Μεσογείου *Ceratitis capitata* Wied (Barry et al., 2004; Gonzalez, 2007). Επίσης χρησιμοποιήθηκε για το *Bactrocera cucurbitae* Coquillett (Kuba et al., 1996), για τη μύγα τσετσε *Glossina austeni* Newst (Abd-alla et al., 2013; Dyck et al., 2006; Vreysen et al., 2000) και για το πορτοκαλί σκουλήκι *Pectinophora gossypiella* Saunders (Staten et al., 1999). Έκτοτε η τεχνική χρησιμοποιήθηκε και για τα κουνούπια στην Ιταλία, με την εξαπόλυση να γίνεται σε κοντινή απόσταση από την περιοχή παραγωγή τους (Bellini et al., 2012) όσο και στην Ελλάδα (Βραυβρώνα) (Balatsos et al., 2021).

Η SIT χρησιμοποιεί ακτινοβολία (ακτίνες γάμμα, ακτίνες X) για τη στείρωση των αρσενικών που εκτρέφονται μαζικά, ώστε όταν συζευγνύονται με τα άγρια θηλυκά τα ωά που παράγονται να είναι άγονα και συνεπώς προκαλείται με φυσικό τρόπο μείωση του πληθυσμού της επόμενης γενεάς. Χαρακτηριστικό της SIT είναι πως εφαρμόζεται με μεγαλύτερη επιτυχία σε περιοχές με ένα είδος ως κυρίαρχο διαβιβαστή (Rendón et al., 2004). Παλαιότερες προσπάθειες για καταπολέμηση των κουνουπιών με τη SIT ήταν λιγότερο επιτυχημένες από το αναμενόμενο κυρίως λόγω της χαμηλής ανταγωνιστικότητας σύζευξης των στερωμένων σε σχέση με τα άγρια αρσενικά

(Ponlawat et al., 2007; Renshaw et al., 1994).

Ενώ έχουν πραγματοποιηθεί αρκετά πειράματα σχετικά με την ανταγωνιστικότητα σύζευξης των στειρωμένων αρσενικών διαφορετικών ειδών εντόμων (Bloem et al., 1998; Bloem et al., 1999; Bloem et al., 2004; Boshra, 1994; Haynes & Smith, 1992; Hooper, 1970; Hooper & Katiyar, 1971; Hooper, 1972; Hooper, 1975; Katiyar, 1973a, b; Saour & Makee, 1997; Toledo et al., 2004; Zumreoglu et al., 1979; Winstead et al., 1990). Όμως είναι χρήσιμο να ερευνηθεί όχι μόνο η επίδραση της δόσης της ακτινοβολίας στην ανταγωνιστικότητα σύζευξης (Bakri et al., 2005a) αλλά και η επίδραση της μεταφοράς των στειρωμένων αρσενικών σε μεγάλες αποστάσεις. Χαρακτηριστικό είναι πως οι παράμετροι ανταγωνιστικότητας των αρσενικών όπως η επιβίωση, η ικανότητα εύρεσης των θηλυκών, η συχνότητα σύζευξης καθώς και η γονιμότητα του σπέρματος επηρεάζονται από την δόση της ακτινοβολίας και το στάδιο ανάπτυξης (Baker et al., 1979) και επηρεάζουν την αναπαραγωγική επιτυχία (Bellini et al., 2007; Bellini et al., 2013; Bloem et al., 2000; Charlwood et al., 2002; Charlwood et al., 2003; Delisle, 1995; Okanda et al., 2002; Olet et al., 2002; Taylor et al., 2001; Yuval et al., 1993; Zuk et al., 1988; Whitten et al., 2005).

Στις εξαπολύσεις στειρωμένων εντόμων πρέπει να λαμβάνονται υπόψη η συχνότητά τους (κάθε εβδομάδα) (Partridge et al., 1987) και η γεωγραφική στόχευση ώστε να μεγιστοποιείται η πιθανότητα σύζευξης με άγρια θηλυκά (White et al., 2010). Υπάρχουν επιτυχή προγράμματα ολοκληρωμένης αντιμετώπισης επιβλαβών οργανισμών (Area Wide – Integrated Pest Management AW-IPM) με τη συνδυαστική χρήση και άλλων μεθόδων εκτός της SIT, όπως συνέβη στην Κίνα για το *Ae. albopictus* (Chansang et al., 2019; Zheng et al., 2019). Η SIT αξιολογείται σε διάφορα είδη κουνουπιών σε 34 χώρες παγκοσμίως (Bouyer et al., 2020).

Η αξιολόγηση της τεχνικής των στειρωμένων εντόμων (SIT) γίνεται με την επιλογή της κατάλληλης θέσης που πρέπει να έχει διαχειρήσιμο μέγεθος, χαμηλή πυκνότητα πληθυσμού κουνουπιών και καλό επίπεδο γεωγραφικής και βιολογικής απομόνωσης (Malcolm et al., 2009). Στην Ελλάδα, πιλοτική εξαπόλυση στειρωμένων αρσενικών του *Ae. albopictus* πραγματοποιήθηκε

στην Βραβρώνα Αττικής και οδήγησε σε σημαντική μείωση στην εκκολαψιμότητα των ωών σε σχέση με περιοχές που δε δέχθηκαν τέτοιου είδους εξαπολύσεις (μάρτυρας) (Balatsos et al., 2021).

1.5.6 Χρήση διαγονιδιακών κουνουπιών

Εκτός από τις προαναφερθείσες μεθόδους καταπολέμησης κουνουπιών με πιο καινοτόμο εξ' αυτών τη SIT, τις τελευταίες δεκαετίες έχει εισαχθεί και η χρήση των διαγονιδιακών κουνουπιών με κυριότερη μέθοδο την απελευθέρωση εντόμων που φέρουν κυρίαρχο θανατηφόρο γονίδιο (RIDL). Άλλη μέθοδος αντιμετώπισης με τη χρήση διαγονιδιακών κουνουπιών είναι η μέθοδος RNAi (McGraw & O'Neill, 2013).

Στη μέθοδο RIDL τα γονίδια των θηλυκών μεταφέρονται στον πληθυσμό από γενετικά τροποποιημένα αρσενικά και μπορεί να προκαλέσουν θνησιμότητα σε νύμφες ή ενήλικα ή να μειώσουν την έκφραση γονιδίου στον μυ της πτήσης, με αποτέλεσμα τα θηλυκά που δεν πετούν να μην μπορούν να τραφούν και να συζευχθούν. Η αρμοστικότητα των άγριων αρσενικών να μεταφέρουν γονίδια στα θηλυκά είναι λιγότερο υποσχόμενη από εκείνη των στερωμένων επειδή η μεταγραφή διαγονιδίων καθοδηγείται από ειδικούς υποκινητές των θηλυκών (McGraw & O'Neill, 2013). Η μέθοδος δοκιμάστηκε επιτυχώς στα νησιά Κέιμαν (Harris et al., 2011) και τα γενετικά τροποποιημένα αρσενικά έδειξαν μειονεκτήματα σύζευξης, γεγονός που θα μπορούσε να αντισταθμιστεί με την απελευθέρωσή τους σε μεγαλύτερο αριθμό.

Το ενδοκυτταρικό βακτήριο *Wolbachia pipientis*

Το ενδοσυμβιωτικό α -πρωτεοβακτήριο *Wolbachia pipientis* καταγράφηκε για πρώτη φορά το 1924 στις ωοθήκες του *Cx. pipiens* (Hertig & Wolbach, 1924) και αποτελεί ίσως το πιο διαδεδομένο μολυσματικό βακτήριο στον πλανήτη (Zimmer, 2001). Απαντάται σε πολλά είδη κουνουπιών, συμπεριλαμβανομένου του *Ae. albopictus* και του *Cx. pipiens* (McGraw & O'Neill, 2013). Σύμφωνα με τους Zug και Hammerstein (2012) το 40% των αρθροπόδων φαίνεται να είναι μολυσμένα με κάποια φυλή της *Wolbachia* (Hilgenboecker et al., 2008; Jeyaparakash & Hoy, 2000; Taylor & Hoerauf,

1999).

Πιο συγκεκριμένα, η *Wolbachia* μπορεί να μειώσει την ικανότητα αναπαραγωγής (McGraw & O'Neill, 2013; Iturbe-Ormaetxe et al., 2011) και να επιφέρει μεταβολές όπως θηλυκοποίηση, παρθενογένεση, θανάτωση αρσενικών εμβρύων καθώς και κυτταροπλασματική ασυμβατότητα σε διαφορετικούς οργανισμούς (O'Neill et al., 1997; Stouthamer et al., 1999). Η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα οδηγεί σε εμβρυικό θάνατο όταν διασταυρώνονται μολυσμένα αρσενικά και μη μολυσμένα (η μολυσμένα με άλλο στέλεχος *Wolbachia*) θηλυκά.

Στην κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (CI) ο εμβρυϊκός θάνατος συμβαίνει όταν τα μολυσμένα αρσενικά συζευγνύονται με μη μολυσμένα θηλυκά ή με μολυσμένα θηλυκά που φέρουν διαφορετικό τύπο *Wolbachia* (Sinkins, 2004). Η ικανότητα του *Wolbachia* να προκαλεί CI στον ξενιστή οδήγησε σε δύο βασικές στρατηγικές για την καταπολέμηση των κουνουπιών.

Υπάρχουν δύο στρατηγικές για την εφαρμογή της *Wolbachia* για την αντιμετώπιση κουνουπιών και σχετικών με αυτά ασθενειών.

Η πρώτη στρατηγική αναφέρεται ως αντικατάσταση πληθυσμού και χρησιμοποιεί τη *Wolbachia* για τη διάδοση επιθυμητών χαρακτηριστικών (όπως ένας αντιπαθογόνος φαινότυπος) στον πληθυσμό (Curtis & Sinkins, 1998; Turelli & Hoffmann, 1999). Η επιτυχία της αντικατάστασης πληθυσμού με τη *Wolbachia* παρατηρήθηκε στα κουνούπια με τεχνητή μόλυνση σε εργαστηριακές και σε μελέτες πεδίου (Hoffmann et al., 2011; Xi et al., 2005).

Η δεύτερη στρατηγική αναφέρεται ως καταστολή του πληθυσμού με την εξαπόλυση αρσενικών κουνουπιών που έχουν μολυνθεί με *Wolbachia*, με αποτέλεσμα τη στειρότητα και μείωση του πληθυσμού των κουνουπιών. Αυτή η στρατηγική είναι παρόμοια με την τεχνική των στειρωμένων εντόμων (SIT) και, κατ' αναλογία, ονομάζεται επίσης «τεχνική ασυμβίβαστων εντόμων» (IIT).

Σε δοκιμή πεδίου, η εξαπόλυση αμφίδρομα μη συμβατών αρσενικών εξάλειψε τον πληθυσμό κουνουπιών *Culex* στη Βιρμανίας (Μυανμάρ) (Laven, 1967). Προσπάθειες για την καταστολή πληθυσμού περιλαμβάνουν επιτυχημένα πειράματα εργαστηρίου με το *Ae. polynesiensis* (Sinkins, 1995)

και με το *Cx. quinquefasciatus* (Atyame et al., 2011) αποδεικνύοντας ότι τα αρσενικά που έχουν μολυνθεί από *Wolbachia* μπορούν να ανταγωνιστούν τα άγρια αρσενικά και να προκαλέσουν στειρότητα στα θηλυκά (Zabalou et al., 2004).

Το *Ae. albopictus* είναι φυσικά μολυσμένο σε ποσοστό που φτάνει περίπου το 100% με δύο τύπους *Wolbachia* (wAlbA και wAlbB) παγκοσμίως (Sinkins et al., 1995). Η τεχνητή μόλυνση με *Wolbachia* αναπτύχθηκε για πρώτη φορά με επιτυχία στο *Ae. albopictus* (Xi et al., 2005). Επίσης, κάθε είδος του συμπλέγματος του *Cx. pipiens* φαίνεται να έχει μολυνθεί με μία μόνο παραλλαγή του στελέχους wPip και η παρατηρούμενη ποικιλομορφία των τύπων της κυτοπλασματικής ασυμβατότητας (Cytoplasmic incompatibility – CI) προκαλείται από παραλλαγή εντός του συμπλέγματος του *Cx. pipiens*. Επιπλέον, το *Ae. aegypti* είναι μολυσμένο από τρία στελέχη της *Wolbachia* (wAlbB, wMelPop και wMel) (McMeniman et al., 2009; Xi et al., 2005; Walker et al., 2011). Η έλλειψη φυσικής μόλυνσης από *Wolbachia* στο *Ae. aegypti* κατέστησε δυνατή την αντικατάσταση πληθυσμού με *Wolbachia* χωρίς την ανάγκη ύπαρξης ενός ήδη μολυσμένου συστήματος για την πρόκληση κυτοπλασματικής ασυμβατότητας (Cytoplasmic incompatibility – CI) μονής κατεύθυνσης, όπως απαιτείται για το *Ae. albopictus*.

Σχετικές έρευνες έδειξαν ότι κανένα από τα 38 είδη *Anopheles* δε φέρει φυσικές λοιμώξεις από *Wolbachia*, συμπεριλαμβανομένων σημαντικών διαβιβαστών της ελονοσίας όπως είναι το *Anopheles gambiae*, το *An. arabiensis*, το *Anopheles funestus* και το *An. stephensi* (Kittayapong, 2000; Bourtzis et al., 2004). Αντίθετα, το 39,5% από τα 147 είδη των Culicinae βρέθηκε θετικό στη *Wolbachia* (Bourtzis et al., 2004).

Μια πρόσφατα επιτυχημένη μεταφορά του wAlbB από το *Ae. albopictus* στο *An. stephensi*, υποδεικνύει ότι το *Anopheles* spp. μπορεί να υποστηρίξει μόλυνση με *Wolbachia* (Bian et al., 2013). Πρόσφατα, στοιχεία υποστήριξαν τον ισχυρισμό ότι η μόλυνση από *Wolbachia* είναι παρούσα στο *An. gambiae* στη Μπουρκίνα Φάσο, Δυτική Αφρική. Ωστόσο, το γενετικό υλικό που εντοπίστηκε στο *An. gambiae* ανήκει σε ένα νέο στέλεχος *Wolbachia*, που σχετίζεται, αλλά διαφέρει από στελέχη που μολύνουν άλλα αρθρόποδα,

υποδηλώνοντας ότι θα μπορούσαν να υπάρχουν διαφορετικά είδη *Wolbachia* που παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστα (Baldini et al., 2013).

1.6 Σκοπός της παρούσας διατριβής

Τα κουνούπια μεταδίδουν ασθένειες που αποτελούν σημαντική απειλή για τη δημόσια υγεία. Η εν εξελίξει κλιματική αλλαγή δημιουργεί πληθώρα ενδiciaτημάτων κατάλληλων για πληθυσμούς κουνουπιών. Η μεταβλητότητα του κλίματος και τα ακραία καιρικά φαινόμενα αναμένεται να αυξήσουν ακόμη περισσότερο τη συχνότητα και τη σοβαρότητα των ασθενειών που μεταδίδονται από τα κουνούπια (Caminade et al., 2019; Fouque & Reede, 2019; Rocklöv & Dubrow, 2020). Επιπλέον, η αστικοποίηση, τα διεθνή ταξίδια, το εμπόριο και η αύξηση του πληθυσμού συμβάλλουν στην εισαγωγή και στη μετάδοση των σχετικών ασθενειών (Petersen et al., 2019). Ο επιτυχής έλεγχος μιας ασθένειας που μεταδίδεται από τα κουνούπια απαιτεί έγκαιρες, πολύπλευρες προσπάθειες καθώς και συντονισμό των φορέων καταπολέμησης (Lemanski et al., 2020; Schwab et al., 2018; Stone et al., 2017; Zhong et al., 2020). Η αποτελεσματική καταπολέμηση των κουνουπιών βασίζεται σε μοντέλα που αξιοποιούν τα βιολογικά χαρακτηριστικά και στοιχεία πινάκων ζωής και γονιμότητας (Lansdowne & Hacker, 1975; Southwood et al., 1972; Tejerina et al., 2009).

Η αντιμετώπιση των κουνουπιών περιλαμβάνει τη χρήση προνυμφοκτόνων και στοχευμένες ενημερωτικές εκστρατίες του κοινού σχετικά με την ανάγκη για μέτρα ατομικής προστασίας, όπως είναι ο προστατευτικός ρουχισμός και οι κουνουπιέρες (Ogden et al., 2019). Παρά τις δεδομένες ανάγκες καταπολέμησης των κουνουπιών και την μακρόχρονη εμπειρία στον τομέα αυτόν οι σχετικές γνώσεις δεν είναι επαρκείς. Σε μια πρόσφατη μελέτη σε περισσότερους από 1000 οργανισμούς καταπολέμησης μεταδοτικών ασθενειών, διαπιστώθηκε πως το 84% των ερωτηθέντων δεν διέθετε επαρκείς γνώσεις για τους διαβιβαστές (Petersen et al., 2019)..

Οι μελέτες για τη βιολογία και αντιμετώπιση των ειδών *Cx. pipiens* και *Ae. albopictus* αφορούν αρκετές χώρες και βιολογικά χαρακτηριστικά τους. Όσον αφορά το *Ae. albopictus* αρκετές έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί για τα

ανήλικα στάδια (συνωστισμός, τροφή) όσο και για το ενήλικο (γεύματα αίματος, ποιοτικός έλεγχος στερημένων εντόμων). Ειδικότερα, αρκετές μελέτες σχετίζονται με την επίδραση της θερμοκρασίας στην περίοδο ανάπτυξης των προνυμφών (Alto et al., 2001; Loubinos et al., 2002) καθώς και με την επίδραση του δια-ειδικού ανταγωνισμού του προνυμφικού σταδίου στην επιβίωση και στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων (Manorenjitha et al., 2012; Yadav et al., 2017; Xue et al., 2010). Σχετικά με τα γεύματα αίματος έχει μελετηθεί εκτενώς η προτίμηση των ξενιστών του *Ae. albopictus* (Bonizzoni et al., 2013; Gratz, 2004; Lozano-Fuentes et al., 2019; Morgi et al., 2020) ενώ λιγοστές έρευνες σχετίζονται με την επίδρασή τους, πραγματοποιήθηκαν σε τρωκτικά, στη διάρκεια ζωής και στην ωοπαραγωγή (Alam & Tuno, 2019; Cui et al., 2019; De Souvik et al., 2022; Harrington et al., 2001). Η επίδραση της σύζευξης στη διάρκεια ζωής έχει μελετηθεί κυρίως για το *Ae. aegypti* (συγγενικό είδος του *Ae. albopictus*). Ο ποιοτικός έλεγχος των στερημένων εντόμων του *Ae. albopictus* έχει αξιολογηθεί στο πεδίο με έντομα που παρήχθησαν σε κοντινή απόσταση από το σημείο εξαπόλυσης (Bellini et al., 2013). Σχετικά με το *Cx. pipiens* και τους βιοτύπους του οι μελέτες επικεντρώνονται κυρίως στην επίδραση της θερμοκρασίας (σταθερές, κυμαινόμενες, ακραίες) (Spanoudis et al., 2019) στη διάρκεια ζωής τους ενώ η ωοπαραγωγή έχει μελετηθεί για το *Cx. pipiens* f. *molestus* χωρίς γεύμα αίματος (Gao et al., 2019).

Η παρούσα διδακτορική διατριβή έχει ως σκοπό έχει να μελετήσει τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των βιοτύπων του *Cx. pipiens* (*Cx. pipiens* f. *pipiens* και *Cx. pipiens* f. *molestus*) όσο και του *Ae. albopictus* ώστε να παραχθούν τα απαραίτητα στοιχεία για τους ελληνικούς πληθυσμούς τα οποία θα χρησιμοποιηθούν σε επιδημιολογικά μοντέλα πρόβλεψης και καταπολέμησης μολυσματικών ασθενειών. Η πειραματική διαδικασία διεξήχθη με ελληνικούς πληθυσμούς και δη από τη Θεσσαλία. Επίσης, επειδή οι κλιματολογικές συνθήκες της Ελλάδας είναι παρόμοιες με εκείνες αρκετών εύκρατων χωρών, τα αποτελέσματα είναι άμεσα εφαρμόσιμα και στα αντίστοιχα περιβάλλοντα.

Η διδακτορική διατριβή αποτελείται από οκτώ κεφάλαια στα οποία θα αναλυθεί η βιολογία των σημαντικότερων κουνουπιών της Θεσσαλίας σε συνάρτηση με τη διαθέσιμη βιβλιογραφία. Ειδικότερα, στα πρώτα τρία κεφάλαια

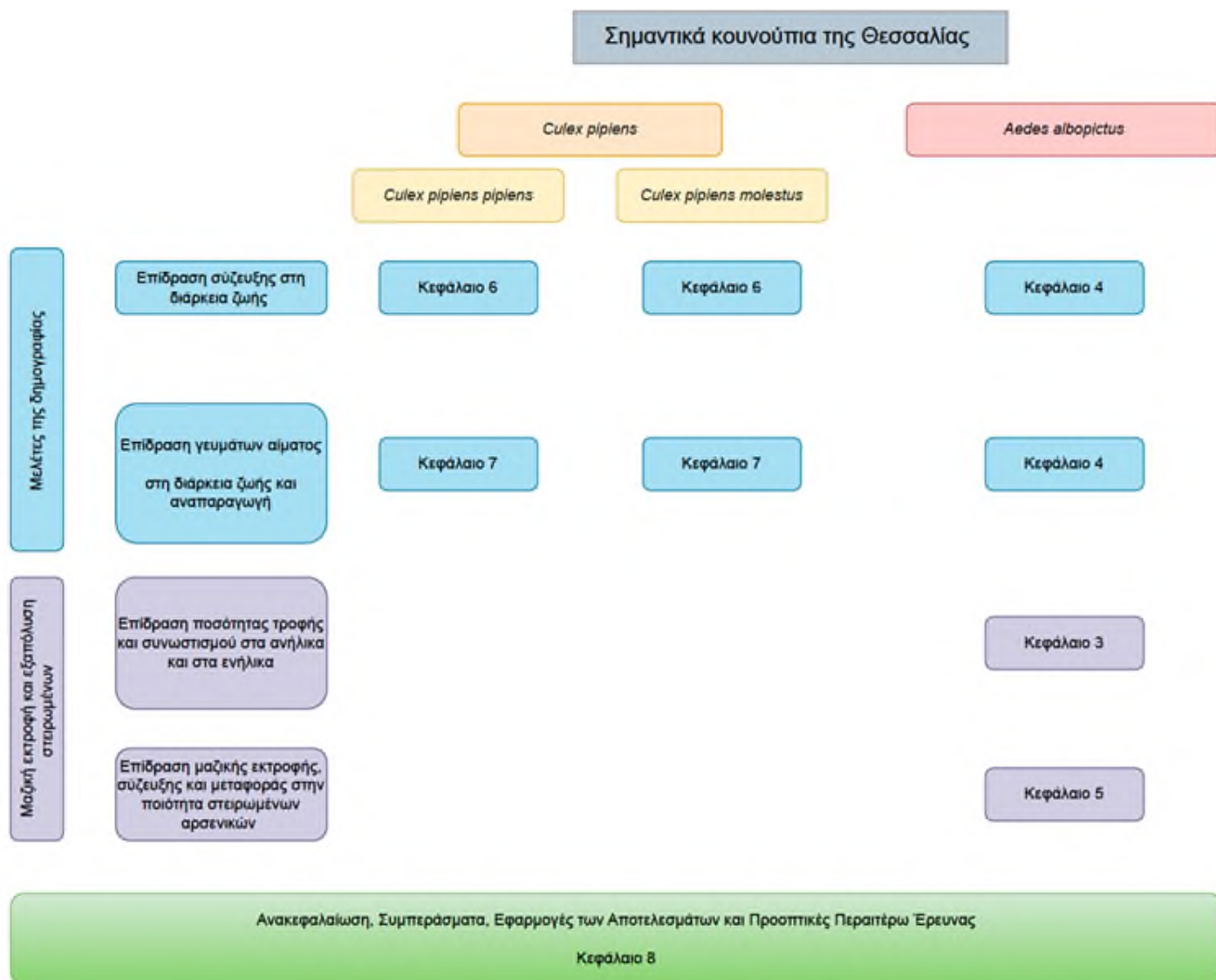
μελετώνται βιολογικοί παράγοντες του *Ae. albopictus* στο ανήλικο και ενήλικο στάδιο καθώς και η επίδραση της μεταφοράς στα ποιοτικά χαρακτηριστικά των στερωμένων αρσενικών ενώ στα επόμενα δύο αναλύεται η δημογραφία (διάρκεια ζωής και ωοπαραγωγικά χαρακτηριστικά) των δύο βιοτύπων του *Cx. pipiens* (*Cx. pipiens* f. *pipiens* και *Cx. pipiens* f. *molestus*).

Συγκεκριμένα, το Κεφάλαιο 1 περιλαμβάνει γενικά στοιχεία για τα κουνούπια και για τη σημασία τους στη δημόσια ζωή. Παρέχεται εμπειριστωμένη έρευνα για την ταξινόμησή τους και για την ανάλυση των μορφολογικών χαρακτηριστικών και για τα τρία γένη τους (*Culex*, *Aedes*, *Anopheles*). Αναλύεται η βιολογία των τριών γενών καθώς και ο βιολογικός τους κύκλος και συσχετίζεται με τη μετάδοση μολυσματικών ασθενειών. Δίνονται στοιχεία για τα σημαντικότερα κουνούπια της Ελλάδας και της Θεσσαλίας. Δίνεται έμφαση στη βιολογία και στις μεθόδους αντιμετώπισης (μηχανική, περιβαλλοντική, χημική, βιολογική, γενετική) του *Cx. pipiens* και των βιοτύπων του (*Cx. pipiens* f. *pipiens* και *Cx. pipiens* f. *molestus*) καθώς και στο *Ae. albopictus*. Στο Κεφάλαιο 2 περιγράφονται τα υλικά και η μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων.

Στο Κεφάλαιο 3 ερευνάται η επίδραση της τροφής και του συνωστισμού των προνυμφών στην επιβίωση και στην περίοδο ανάπτυξης των ανήλικων σταδίων (προνύμφες, νύμφες) καθώς και στην διάρκεια ζωής και στο μέγεθος των πτερύγων των ενηλίκων του *Ae. albopictus*. Στο Κεφάλαιο 4 μελετάται για το *Ae. albopictus* η επίδραση της σύζευξης στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων καθώς και η επίδραση ενός και πολλαπλών γευμάτων αίματος στη διάρκεια ζωής και στα ωοπαραγωγικά χαρακτηριστικά τους. Στο Κεφάλαιο 5 αναλύεται η επίδραση της μεταφοράς στα ποιοτικά χαρακτηριστικά στερωμένων αρσενικών του *Ae. albopictus*. Μελετάται το ποσοστό θηλυκών σε σύνολο αρσενικών στερωμένων κατά τη διαδικασία διαχωρισμού φύλλου στη μαζική παραγωγή των στερωμένων αρσενικών από Μαυροβούνιο, Ιταλία και Ελλάδα με θηλυκά καθώς και η επίδραση της μεταφοράς τους στην επιβίωση των αρσενικών. Επίσης μελετάται η επίδραση της πυκνότητας κατά τη μεταφορά στην ικανότητα πτήσης καθώς και η επιβίωση επιβίωση των στερωμένων αρσενικών, τα ημερήσια πρότυπα της συχνότητας σύζευξης άγριων και στερωμένων αρσενικών, η ανταγωνιστικότητα σύζευξης σε πειράματα

επιλογής και μη επιλογής καθώς και η έλλειψη τροφής, νερού και καθώς και των δύο στην επιβίωση στερωμένων και άγριων αρσενικών. Στο Κεφάλαιο 6 μελετάται η επίδραση της σύζευξης στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων των βιοτύπων του *Cx. pipiens* (*Cx. pipiens* f. *pipiens* και *Cx. pipiens* f. *molestus*) καθώς και το προσδόκιμο ζωής τους. Στο Κεφάλαιο 7 μελετάται η επίδραση του γεύματος αίματος στη διάρκεια ζωής και στα ωοπαραγωγικά χαρακτηριστικά των ενηλίκων από τους βιότυπους του *Cx. pipiens* (*Cx. pipiens* f. *pipiens* και *Cx. pipiens* f. *molestus*) καθώς και το προσδόκιμο ζωής τους.

Στο Διάγραμμα 1 απεικονίζεται συνολικά ο σκοπός της παρούσας διατριβής.



Διάγραμμα 1. Απεικόνιση του σκοπού της παρούσας διατριβής

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2 ΓΕΝΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Εργαστηριακές συνθήκες

Τα πειράματα διεξήχθησαν την χρονική περίοδο 2016 - 2021 σε εντομοδωμάτια διαστάσεων 5 x 3 x 2,5 m στο εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Οι συνθήκες που επικρατούσαν κατά την διάρκεια των πειραμάτων ήταν θερμοκρασία 25 ± 2 °C, σχετική υγρασία $65 \pm 5\%$ και φωτοπερίοδος 14:10 (Φ:Σ) ενώ η φωτόφαση ρυθμίστηκε από τις 07:00 έως και τις 21:00 h. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με τεχνητό φως προερχόμενο από λαμπτήρες φθορίου (day light type), η ένταση του οποίου αυξανόταν προοδευτικά μία ώρα πριν την αυγή και μειωνόταν μία ώρα πριν το σούρουπο. Η ένταση φωτός στα εντομοδωμάτια κυμαινόταν από 800 έως 1000 Lux.

2.2 Πληθυσμοί που χρησιμοποιήθηκαν και μέθοδος εκτροφής τους

Στα πειράματα που αναφέρονται στα επόμενα κεφάλαια της διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκαν πληθυσμοί κουνουπιών των ειδών *Cx. pipiens* f. *pipiens*, *Cx. pipiens* f. *molestus* και *Ae. albopictus* που προέρχονται από τη Θεσσαλία και ειδικότερα από την περιοχή της Λάρισας και του Βόλου.

2.2.1 *Culex pipiens* sp.

Για τη συλλογή των σχεδίων ωών, τοποθετήθηκαν 20 πλαστικά δοχεία (10 σε κάθε πόλη) (Πίνακας 1) με 15 lt νερού βρύσης στο κάθε δοχείο σε αυλές σπιτιών και σε πάρκα σε κοντινές αποστάσεις μεταξύ τους (300 – 500 m) και σε σημεία προστατευμένα από δυνατούς ανέμους και από το φως του ήλιου. Τα μισά από τα πλαστικά δοχεία τοποθετήθηκαν σε αυλές σπιτιών και τα υπόλοιπα κοντά σε μέρη όπου υπήρχαν οικόσιτα ζώα. Προηγούμενες έρευνες στην περιοχή μελέτης έδειξαν πως το *Cx. pipiens* είναι το πιο άφθονο είδος, ακολουθούμενο από το *Aedes caspius* (Πετππέ, 2015).

[73]

Οι σχεδίες ωών του *Cx. pipiens* που συλλέχθηκαν για τις αποικίες μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο (θερμοκρασία 25 ± 2 °C, σχετική υγρασία $65 \pm 5\%$ και φωτοπερίοδος 14:10 (Φ:Σ) με σκοπό να καθοριστεί ο βióτυπός τους. Ειδικότερα, κάθε σχεδία ωών τοποθετήθηκε σε πλαστικό κυλινδρικό κύπελλο 500ml σε διαφανή κλωβό Plexiglass 20 x 20 x 20 cm.

Μετά την εκκόλαψη των ωών και την ολοκλήρωση της ανάπτυξης των προνυμφών αφαιρέθηκε το νερό από το πλαστικό κυλινδρικό κύπελλο ώστε τα ενήλικα να μην πνιγούν και να μην αποθέσουν ωά. Αφέθηκαν 6 ημέρες ώστε να ωριμάσουν αναπαραγωγικά και την 7^η ημέρα προστέθηκε ξανά νερό για τέσσερις ημέρες στο πλαστικό κυλινδρικό κύπελλο που υπήρχε στον κλωβό ώστε να δοθεί η δυνατότητα ωοτοκίας. Στα ενήλικα παρέχονταν διάλυμα ζάχαρης 10% w/v, ώστε να καλυφθούν οι διατροφικές τους ανάγκες. Τα ενήλικα θηλυκά που ωοτόκησαν χωρίς γεύμα αίματος κατατάχθηκαν στον βióτυπο *Cx. pipiens* f. *molestus* (αυτογενή), ενώ εκείνα που δεν ωοτόκησαν στον βióτυπο *Cx. pipiens* f. *pipiens* (αναυτογενή). Αφού πέρασαν οι τέσσερις ημέρες δόθηκε γεύμα αίματος και στα θηλυκά των κλωβών που δεν είχαν ωοτοκήσει ώστε να ελεγχθεί η ωοτοκία με γεύμα αίματος. Για τη διατροφή με γεύμα αίματος χορηγήθηκε από μικροβιολογικό εργαστήριο πιστοποιημένο (απαλλαγμένο από μολυσματικές ασθένειες) ανθρώπινο αίμα μέσω μεμβράνης Parafilm® M (Bemis, Neenah, WI, USA) με αυτοσχέδια κυλινδρική συσκευή (7,5 cm διάμετρο και 10 cm ύψος), συσκευή διατροφής κουνουπιών που λειτουργεί με νερό που κυκλοφορεί από συσκευή που θερμαίνει το νερό μέσω μικρών αντλιών νερού 12 V DC. Η συσκευή τοποθετήθηκε στην κορυφή του κάθε κλωβού για 1 ώρα ώστε τα θηλυκά να έχουν πρόσβαση στο αίμα που είχε θερμοκρασία 38 °C και προσομοίαζε τη θερμοκρασία του ανθρώπινου αίματος (Ioannou et al., 2021).

Η μεμβράνη πριν τοποθετηθεί στη συσκευή ήρθε σε επαφή με το δέρμα εθελοντή ώστε να μην έχει την οσμή της μεμβράνης αλλά να εμποτιστεί με τις οσμές του δέρματος, αφού σκοπός ήταν η προσομοίωσή του. Ομοίως το αίμα μέσω της συσκευής διατηρούνταν σε θερμοκρασία που επικρατεί στον άνθρωπο (περίπου στους 38 °C). Η συσκευή τοποθετήθηκε στο επάνω μέρος των κλωβών για μία ώρα ώστε να αποφευχθεί η πιθανότητα της μη λήψης γεύματος αίματος λόγω συνωστισμού κουνουπιών στη μεμβράνη.

Τα ενήλικα θηλυκά αφού έπεμψαν το αίμα (όπως προέκυψε από τον μεταχρωματισμό της κοιλίας τους από κόκκινη σε λευκή) ωοτόκησαν.

Προέκυψε πως από τις αρχικές σχεδίες ωών που συλλέχθηκαν οι 74 ανήκαν στο *Cx. pipiens* f. *pipiens* και οι 59 στο *Cx. pipiens* f. *molestus*. Στη συνέχεια, οι κλωβοί κάθε βιότυπου μεταφέρθηκαν σε διαφορετικά εντομοδωμάτια ώστε να μην υπάρξει επιμόλυνση. Για επαλήθευση του διαχωρισμού των βιοτύπων επαναλήφθηκε η διαδικασία και για ακόμη τρεις γενιές και έκτοτε ο διαχωρισμός των βιοτύπων επιβεβαιώθηκε και με τη μέθοδο MALDI-TOF MS (Dieme et al., 2014) και στη συνέχεια εγκαταστάθηκαν οι αποικίες στο εργαστήριο (Ioannou et al., 2021).

2.2.2. *Aedes albopictus*

Για τις αποικίες του *Ae. albopictus* συλλέχθηκαν ωά από 20 παγίδες ωοθεσίας (Εικόνα 2.1) στην ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας (Πίνακας 2.1). Οι παγίδες ωοθεσίας εγκαταστάθηκαν σε υπαίθριους χώρους και αποτελούνταν από μαύρα πλαστικά κυλινδρικά δοχεία (παγίδες ωοθεσίας) (διάμετρος 11 cm, ύψος 15 cm) που στο εσωτερικό έφεραν δέκα ξύλινα γλωσσοπίεστρα με αδρή επιφάνεια 15 x 2 cm, νερό και μικρή ποσότητα εμπορικής ζωοτροφής (grounded Friskies adult) ως ελκυστικό (Giatropoulos et al., 2012). Οι παγίδες ωοθεσίας ήταν μισογεμάτες με νερό βρύσης και στο εσωτερικό τους μέρος ήταν προσκολλημένα δέκα ξύλινα γλωσσοπίεστρα που στην εσωτερική πλευρά τους είχαν αδρή επιφάνεια και λειτουργούσαν ως υπόστρωμα ωοτοκίας των ωών του γένους *Aedes*. Τα κουνούπια εναπόθεταν τα ωά τους στο υγρό ξύλινο αδρό γλωσσοπίεστρο και σε ύψος πάνω από την επιφάνεια του νερού. Τα γλωσσοπίεστρα συλλέγονταν κάθε 8-10 ημέρες, σφραγίζονταν σε πλαστικές θήκες και μεταφέρονταν στο εργαστήριο (Ioannou et al., 2021). Τα ωά εκκολάπτονταν σε εργαστηριακές συνθήκες όμοιες με εκείνες του γένους *Cx. pipiens* και ακολουθούνταν η ίδια διαδικασία. Για την ταυτοποίηση του είδους στο ενήλικο στάδιο χρησιμοποιήθηκε ξανά η μέθοδος MALDI-TOF MS, όπως προαναφέρθηκε και έγινε αναγνώριση των μορφολογικών χαρακτηριστικών σε 100 ενήλικα άτομα που είχε ως αποτέλεσμα την ταυτοποίηση με το κουνούπι *Ae. albopictus* και όχι με το συγγενές *Ae. cretinus* που απαντάται σε Μεσογειακές χώρες όπως στην Ελλάδα, Κύπρο και Τουρκία (Edwards, 1921; Giatropoulos et al., 2012; Samanidou, 1998).



Εικόνα 2.1 Παγίδα ωοθεσίας με γλωσσοπίεστρο ωών κουνουπιών του γένους *Aedes*

Πίνακας 2.1 Περιοχές προέλευσης και γεωγραφικές συντεταγμένες από όπου προέρχονταν οι διαφορετικοί πληθυσμοί του *Culex pipiens* και του *Aedes albopictus* που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα.

Πόλη προέλευσης	Περιοχή	Γεωγραφικές συντεταγμένες	
		Γεωγραφικό μήκος	Γεωγραφικό πλάτος
Λάρισα	Ραφήνας	22°23'36.65"	39°37'21.54"
Λάρισα	Ραφήνας	22°23'36.12"	39°37'22.11"
Λάρισα	Πλαπούτα	22°23'35.87"	39°37'35.35"
Λάρισα	Θηβών	22°23'26.90"	39°37'30.86"
Λάρισα	Πηνειός	22°24'41.18"	39°38'25.57"
Λάρισα	Πηνειός	22°24'46.12"	39°38'34.63"
Λάρισα	Κτελ	22°25'23.59"	39°38'41.07"
Λάρισα	ΟΠΕΚΕΠΕ	22°25'23.59"	39°36'38.54"
Λάρισα	Ινστιτούτο Βιομηχανικών Φυτών	22°25'24.20"	39°36'41.83"
Βόλος	Σχολή Γεωπονικών Επιστημών	22°56'24.04"	39°23'16.14"
Βόλος	Σχολή Γεωπονικών Επιστημών	22°56'27.67"	39°23'17.48"
Βόλος	Σχολή Γεωπονικών Επιστημών	22°56'.29.50"	39°23'.18.38"
Βόλος	Σχολή Γεωπονικών Επιστημών	22°56'.25.41"	39°23'.17.89"
Βόλος	Ποτάμι	22°54'.4.99"	39°22'.9.26"
Βόλος	Ποτάμι	22°56'.29.59"	39°22'.21.01"
Βόλος	Ποτάμι	22°56'.45.38"	39°22'.27.33"
Βόλος	Καποδιστρίου	22°56'.34.31"	39°23'.3.51"
Βόλος	Καποδιστρίου	22°56'.28.34"	39°23'.9.20"
Βόλος	Ποτάμι	22°56'.53.83"	39°23'.31.33"

2.3 Εκτροφή κουνουπιών

2.3.1 *Culex* sp

Οι προνύμφες εκτρέφονταν σε λευκές, πλαστικές λεκάνες 42 x 30 x 10cm (Εικόνα 2.2) πυκνότητας προνυμφών ανά λεκάνη 1000 άτομα με 3L λίτρα νερού και επαρκή ποσότητα αλεσμένης γατοτροφής (Friskies Adult, Purina, Italy).



Εικόνα 2.2 Λεκάνη εκτροφής προνυμφών κουνουπιών 42 x 30 x 10 cm.

Οι νύμφες συλλέγονταν με πλαστικές πιπέτες τύπου Pasteur και μεταφέρονταν σε λευκά κυλινδρικά κύπελλα 500 ml μέσα σε κλωβούς εκτροφής BugDorm-4F2222 Insect Rearing Cage διαστάσεων 32,5 x 32,5 x 32,5 cm (Εικόνα 2.3) μέχρι την ενηλικίωσή τους.



Εικόνα 2.3 Κλωβός εκτροφής ενηλίκων κουνουπιών.

Με την ενηλικίωση όλων των εντόμων αφαιρούνταν το νερό από την λεκάνη που υπήρχε στον κλωβό εκτροφής ώστε να μην πνιγούν και να μην αποθέσουν ασυγχρόνιστα τις σχεδίες ωών. Τα ενήλικα άτομα διατηρούνταν στους κλωβούς εκτροφής σε πυκνότητα 400-500 άτομα ανά κλωβό και τρέφονταν με υδατικό διάλυμα ζάχαρης 10% που ανανεώνονταν κάθε εβδομάδα. Για την εκτροφή του *Cx. pipiens* f. *pipiens* την 7^η ημέρα μετά την ενηλικίωση – αυτή η χρονική περίοδος θεωρείται επαρκής για τη σύζευξη παρέχονταν το πρώτο γεύμα αίματος στα θηλυκά με πιστοποιημένο ανθρώπινο αίμα με αυτοσχέδια κυλινδρική συσκευή (7,5 cm διάμετρο και 10 cm ύψος), συσκευή τροφοδοσίας που λειτουργεί με νερό που κυκλοφορεί από συσκευή που θερμαίνει το νερό μέσω μικρών αντλιών νερού 12 V DC με την ίδια διαδικασία που ακολουθήθηκε για την εγκατάσταση της αποικίας (Βλέπε ενότητα 2.2.1).

Ανάλογα με τις πειραματικές ανάγκες για την εκτροφή τα κουνούπια λάμβαναν δύο ή τρία γεύματα αίματος κάθε μήνα. Η εκτροφή του *Cx. pipiens* f. *molestus* συνεχιζόταν χωρίς τα κουνούπια να έχουν πρόσβαση σε αίμα. Σε ορισμένες περιπτώσεις τους δόθηκε γεύμα αίματος μετά από την πρώτη αυτογόνιμη σχεδία ωών με σκοπό να ενισχυθεί η εκτροφή. Έγινε εκτροφή των πληθυσμών για τρεις γενιές ώστε να δημιουργηθεί ομοιόμορφο γενετικό υλικό πριν από τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Μετά τη πέψη του αίματος από τα θηλυκά, τοποθετούνταν νερό στο λευκό πλαστικό κυλινδρικό κύπελλο 500 ml ώστε αυτά να ωοτοκήσουν και στη συνέχεια οι σχεδίες ωών μεταφέρονταν στις

λεκάνες εκτροφής με διηθητικό χαρτί.

Για να προσδιοριστεί η διάρκεια ζωής των συζευγμένων και παρθένων αρσενικών και θηλυκών ενήλικων κουνουπιών χρησιμοποιήθηκαν ατομικοί κλωβοί ενηλίκων που κατασκευάστηκαν από ένα διαφανές πλαστικό κύπελλο χωρητικότητας 400 mL που τοποθετήθηκε ανεστραμένο και στερεώθηκε στο καπάκι ενός τρυβλίου Petri διαμέτρου 9 cm. (Εικόνα 2.4). Ένα πλαϊνό παράθυρο (3 cm x 5 cm) χρησίμευε για αερισμό, ενώ μια μικρή οπή στο επάνω μέρος παρείχε τη δυνατότητα εισόδου στον κλωβό. Τροφή στα ενήλικα (διάλυμα ζάχαρης 5%) παρεχόταν από ένα βαμβακερό φυτίλι που περνούσε από τη βάση του κλωβού στην κάτω βάση του τρυβλίου Petri. Οι θάνατοι καταγραφόταν καθημερινά μέχρι το θάνατο του τελευταίου ατόμου.



Εικόνα 2.4 Ατομικοί κλωβοί ενηλίκων 400 mL για καταγραφή της διάρκειας ζωής

Για την ωοπαραγωγή του *Culex* sp. τα ενήλικα θηλυκά τοποθετούνταν σε διαφανή κλωβό Plexi glass 15 x 15 x 15 cm (Εικόνα 2.5) που είχε τις δύο πλευρές καλυμμένες με μαλακό τούλι για αερισμό και στο εσωτερικό βρίσκονταν δοχείο 7 x 10 x 2 cm για εναπόθεση των σχεδίων ωών.



Εικόνα 2.5 Plexi glass κλωβός ωτοκίας κουνουπιών του γένους *Culex*

Για την εκτροφή των ανήλικων σταδίων χρησιμοποιήθηκαν πλαστικά κυλινδρικά κύπελλα 500 ml με παροχή τροφής ανά 2 ημέρες ενώ στο στάδιο της νύμφης μεταφέρονταν σε πλαστικά κυλινδρικά κύπελλα 250 ml που έφεραν όμοιο καπάκι με οπές για αερισμό.

2.3.2. *Aedes albopictus*

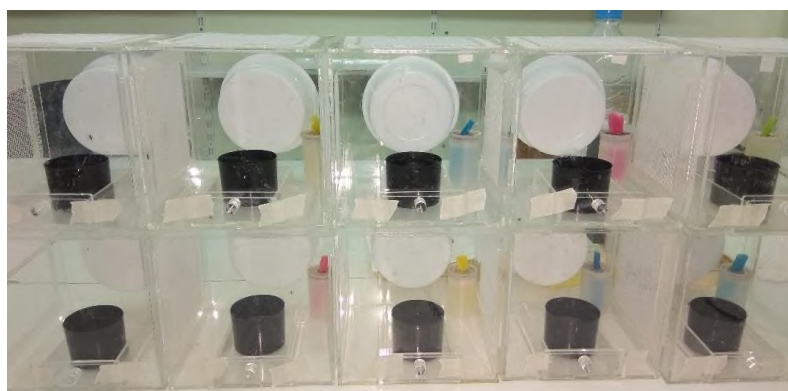
Τα ξύλινα γλωσσοπίεστρα που συλλέγονταν από τις παγίδες ωθεσίας (Εικόνα 1) κρατούνταν σφραγισμένα σε εργαστηριακές συνθήκες (25°C, 65%RH, 14:10 L:D) και ξηραίνονταν για 24 ώρες. Για την εκκόλαψη και τον συγχρονισμό των ωών τα γλωσσοπίεστρα βυθίζονταν σε 1 λίτρο νερού που επωάστηκε σε αναερόβιες συνθήκες για 24 ώρες με 0,1 g εμπορικής γατοτροφής (τριμμένο Friskies για ενήλικα άτομα), διαδικασία που αποφέρει τη μείωση του ποσοστού οξυγόνου και την ανάπτυξη μικροοργανισμών (βακτήρια). Μετά το χρονικό διάστημα των 24 ωρών και μετά την εκκόλαψη 2500 – 3000 προνυμφών, αυτές τοποθετούνταν σε λευκές, πλαστικές λεκάνες 42 x 30 x 10 cm με 3L λίτρα νερού (Εικόνα 2.2) και επαρκή τροφή ώστε οι διατροφικές διαφορές στα ενήλικα αρσενικά και θηλυκά να θεωρούνται αμελητέες. Κατόπιν, οι νύμφες συλλέγονταν με πλαστικές πιπέτες τύπου Pasteur και μεταφέρονταν σε πλαστικές λεκάνες 500 ml σε κλωβούς εκτροφής BugDorm-4F2222 Insect Rearing Cage (Εικόνα 2.3) ώστε να ενηλικιωθούν. Σε κάθε κλωβό βρίσκονταν 500 ενήλικα κουνούπια τα οποία είχαν πρόσβαση σε υδατικό διάλυμα ζάχαρης 10% το οποίο ανανεωνόταν κάθε εβδομάδα. Την 7^η

ημέρα μετά την ενηλικίωση, επαρκής χρονική περίοδος για σύζευξη, παρέχονταν στα θηλυκά το πρώτο γεύμα αίματος με την “εισαγωγή του χεριού του ερευνητή” στον κλωβό εκτροφής BugDorm-4F2222 Insect Rearing Cage (32,5 × 32,5 × 32,5 cm) για 10 – 15 λεπτά μέχρι να λάβει γεύμα αίματος το 90% των θηλυκών, αφού το χέρι είχε καλυφθεί με πλαστικό γάντι μέχρι τον καρπό.

Για να προσδιοριστεί η διάρκεια ζωής των συζευγμένων και παρθένων αρσενικών και θηλυκών ενήλικων κουνουπιών χρησιμοποιήθηκαν ατομικοί κλωβοί ενηλίκων που κατασκευάστηκαν από ένα διαφανές πλαστικό κύπελλο χωρητικότητας 400 mL που τοποθετήθηκε ανεστραμμένο και στερεώθηκε στο καπάκι ενός τρυβλίου Petri διαμέτρου 9 cm. (Εικόνα 2.4). Ένα πλαϊνό παράθυρο (3 cm x 5 cm) χρησίμευε για αερισμό, ενώ μια μικρή οπή στο επάνω μέρος παρείχε τη δυνατότητα εισόδου στον κλωβό. Τροφή στα ενήλικα (διάλυμα ζάχαρης 5%) παρεχόταν από ένα βαμβακερό φυτίλι που περνούσε από τη βάση του κλωβού στην κάτω βάση του τρυβλίου Petri. Οι θάνατοι καταγραφόταν καθημερινά μέχρι το θάνατο του τελευταίου ατόμου.

Για την ωοπαράγωγή του *Aedes* sp. τα ενήλικα θηλυκά τοποθετούνταν σε διαφανή κλωβό Plexi glass 15 x 15 x 15 cm (Εικόνα 2.6) που είχε τις δύο πλευρές καλυμμένες με μαλακό τούλι για αερισμό και στο εσωτερικό βρίσκονταν μαύρο κυλινδρικό κύπελλο 20ml που το εσωτερικό του καλύπτονταν από αδρό σκουρόχρωμο διηθητικό χαρτί για εναπόθεση αυγών.

Για την εκτροφή των ανήλικων σταδίων χρησιμοποιήθηκαν πλαστικά κυλινδρικά κύπελλα 500 ml με παροχή τροφής ανά 2 ημέρες ενώ στο στάδιο της νύμφης μεταφέρονταν σε πλαστικά κυλινδρικά κύπελλα 250 ml που έφεραν όμοιο καπάκι με οπές για αερισμό.



Εικόνα 2.6 Κλωβός ωοτοκίας κουνουπιών του γένους *Aedes*

2.4 Διαχείριση και ανάλυση δεδομένων

Πραγματοποιήθηκε περιγραφική και επαγωγική στατιστική ανάλυση. Η κανονική κατανομή των ποσοτικών μεταβλητών επαληθεύτηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία Shapiro-Wilk. Εφαρμόστηκαν παραμετρικές και μη παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης αναλόγως ενδείξεων. Οι ποσοτικές μεταβλητές περιγράφονται με μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις, ή τυπικά σφάλματα και η παρουσίαση συμπληρώνεται με την αναφορά των εκατοστιαίων θέσεων. Οι ποιοτικές μεταβλητές περιγράφονται με ποσοστά και αναλύονται χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χι τετράγωνο (χ^2). Για τις συγκρίσεις των ποσοτικών μεταβλητών μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιήθηκαν οι δοκιμασίες ANOVA και t -test, ενώ η μελέτη της επίδρασης των γευμάτων αίματος (1^ο και 2^ο γεύμα αίματος στις δημογραφικές παραμέτρους στις δύο φάσεις του πειράματος) έγινε με τη δοκιμασία paired t -test. Οι καμπύλες Kaplan-Meier χρησιμοποιήθηκαν για να αποτυπωθεί η επιβίωση. Η επίδραση της σύζευξης, του φύλου και η αλληλεπίδραση αυτών στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων ελέγχθηκε με το πρότυπο ανάλογων κινδύνων Cox (Cox proportional hazards model). Η σύγκριση παρθένων και συζευγμένων αρσενικών και θηλυκών ως προς τον χρόνο ζωής τους πραγματοποιήθηκε κατά ζεύγη με τον έλεγχο Log-rank (Mantel-Cox). Ομοίως εξετάστηκε και η επίδραση των γευμάτων αίματος (κανένα, ένα και δύο γεύματα αίματος) στην διάρκεια ζωής των θηλυκών. Η ανάλυση επιβίωσης χρησιμοποιήθηκε για να προσδιοριστεί και να συγκριθεί η μακροβιότητα των άγριων και στερωμένων αρσενικών στις διαφορετικές διατροφικές συνθήκες. Η επίδραση του γεύματος αίματος στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων επίσης ελέγχθηκε με το πρότυπο ανάλογων κινδύνων Cox.

Γενικευμένα γραμμικά μοντέλα (Generalized Linear Models - GLMs) εφαρμόστηκαν προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση του συνωστισμού των προνυμφών, του φύλου και της δόσης τροφής στην επιβίωση των προνυμφών καθώς και για να ελεγχθεί η επίδραση των γευμάτων αίματος (ένα και δύο γεύματα αίματος) στα δημογραφικά χαρακτηριστικά όπως η ωοπαραγωγή, αριθμός νυμφών, ποσοστό αυγών που έγιναν νύμφες, αριθμός ενηλίκων

απογόνων, αριθμός αρσενικών και θηλυκών απογόνων, αναλογία αρσενικών και θηλυκών. Ομοίως, η επίδραση της φυλής των κουνουπιών, το επίπεδο ακτινοβολίας και ο γονοτροφικός κύκλος στον ρυθμό εκκόλαψης ωών διερευνήθηκαν με GLM.

Γενικευμένο γραμμικό μοντέλο (Generalized Linear Model - GLM) ακολουθούμενο από τη δοκιμασία HSD του Tukey's για post-hoc συγκρίσεις χρησιμοποιήθηκε μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών κουνουπιών από Ελλάδα (GR), Μαυροβούνιο (MNE) και Ιταλία (RER) στην υπολειπόμενη μόλυνση του πληθυσμού με θηλυκά μετά τον μηχανικό διαχωρισμό των φύλων των νυμφών μαζικής εκτροφής. Τα υπολειπόμενα ποσοστά γονιμότητας διορθώθηκαν με τον τύπο διόρθωσης του Abbott (WHO, 2020). Η ανάλυση δεδομένων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το στατιστικό πακέτο IBM SPSS 25 (IBM Corp., Armonk, NY). Το Ms Excel χρησιμοποιήθηκε για τη σχεδίαση γραφημάτων. Πιο αναλυτικά στοιχεία για τα υλικά και τις μεθόδους παρέχονται στα επιμέρους κεφάλαια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΝΩΣΤΙΣΜΟΥ ΠΡΟΝΥΜΦΩΝ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΝΗΛΙΚΩΝ ΣΤΑΔΙΩΝ ΚΑΙ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΤΟΥ *Aedes albopictus* (DIPTERA: CULICIDAE)

3.1 Περίληψη

Το *Aedes albopictus*, γνωστό ως Ασιατικό κουνούπι τίγρης, είναι ένα από τα σημαντικότερα είδη εισβολείς κουνουπιών (χωροκατακτητικά) στον κόσμο, δρα ως διαβιβαστής σοβαρών ασθενειών που απειλούν τη δημόσια υγεία και χρησιμοποιεί εφήμερες και σχετικά μικρές εστίες για την αναπαραγωγή του. Συνεπώς, οι προνύμφες του αντιμετωπίζουν συνθήκες συνωστισμού που συνεπάγεται ανταγωνισμός και διατροφική καταπόνηση, που μπορεί να επηρεάσουν την επιβίωση, το ρυθμό ανάπτυξης, τη διάρκεια ζωής και το μέγεθος του σώματός τους. Μελετήθηκε σε ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες, θερμοκρασία (25⁰ C), υγρασία (65 ± 5% RH) και φωτοπερίοδο (14:10 L:D) η επίδραση του συνωστισμού και της ποσότητας τροφής στο ποσοστό επιβίωσης και στην περίοδο ανάπτυξης των ανήλικων σταδίων (προνύμφες, νύμφες), καθώς και η μακροβιότητα και το μέγεθος των πτερυγών των ενηλίκων του *Ae. albopictus*. Οι προνύμφες εκτράφηκαν σε 3 διαφορετικές πυκνότητες 100, 300 και 600 προνύμφες/λίτρο νερού με ποσότητα τροφής 1, 2 mg/lit για όλες τις πυκνότητες. Στο επίπεδο των 300 προνυμφών /1 lt νερού παρατηρήθηκε το υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης προνυμφών και στις δύο ποσότητες τροφής. Ο συνωστισμός των προνυμφών, η ποσότητα τροφής και η αλληλεπίδρασή τους επέδρασαν σημαντικά στην περίοδο ανάπτυξης των προνυμφών, ενώ στην περίοδο ανάπτυξης των νυμφών επέδρασε σημαντικά ο συνωστισμός των προνυμφών κυρίως στο επίπεδο των 300 προνυμφών / 1lt και των δύο ποσοτήτων τροφής. Το φύλο και ο συνωστισμός των προνυμφών επέδρασαν σημαντικά στη μακροβιότητα των ενηλίκων. Η ποσότητα τροφής

επηρέασε το μέγεθος των πτερύγων και στα δύο φύλα. Συμπερασματικά, στις προνύμφες η επιβίωση ήταν μεγαλύτερη σε επίπεδο συνωστισμού 300 προνύμφες / 1 lt ανεξαρτήτου ποσότητας τροφής και παρατηρήθηκε μεγαλύτερη περίοδος ανάπτυξης στη μικρότερη ποσότητα τροφής και στα τρία επίπεδα συνωστισμού. Στα ενήλικα, σε κάθε επίπεδο συνωστισμού και ποσότητα τροφής τα θηλυκά σε σχέση με τα αρσενικά ήταν μακροβιότερα και είχαν μεγαλύτερο μέγεθος πτερύγων.

3.2 Εισαγωγή

Το ασιατικό κουνούπι τίγρης *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae), προέρχεται από τη νοτιοανατολική Ασία. Τις τελευταίες τέσσερις δεκαετίες έχει εξαπλωθεί σχεδόν σε όλο τον κόσμο, μεταδίδοντας σε ανθρώπους και ζώα ιογενείς ασθένειες και παράσιτα, όπως είναι ο ιός Zika, ο Chikungunya, ο δάγγειος πυρετός και η διροφιλαρίαση (νηματώδεις σκώληκες *Dirofilaria immitis* και *Dirofilaria repens* αντίστοιχα) (Bonizzoni et al., 2013; Gratz, 2004; Medlock et al., 2012).

Στην Ευρώπη, το *Ae. albopictus* βρέθηκε στην Αλβανία το 1979 και στην Ιταλία το 1990 και μέσα σε 25 χρόνια εξαπλώθηκε σε 25 ευρωπαϊκές χώρες. Θεωρείται ότι συνέβαλε στην επιδημία του ιού Ζίκα στη Γαλλική Πολυνησία το 2013 (σύνδρομο Zika, σύνδρομο Guillain-Barré, νευροπάθεια και μυελίτιδα) (ECDC, 2023) και στην αυτόχθονη μετάδοση του ιού Chikungunya στην Ιταλία και στη Γαλλία (Medlock et al., 2015). Επίσης, φαίνεται να συνδέεται με αυτόχθονα περιστατικά δάγγειου πυρετού που σημειώθηκαν στην Ισπανία (2018-2019), στην Ιταλία (2020) και στη Γαλλία (2018 – 2021) (ECDC, 2022). Στην Ολλανδία, πιθανότατα εισήχθη (Benedict et al., 2007) από την Κίνα με τα μπαμπού εσωτερικού χώρου (lucky bamboo - τυχερά μπαμπού) (Scholte et al., 2008), ενώ στη νότια Φλόριντα μέσω του εμπορίου ελαστικών (Scholte et al., 2010).

Το *Ae. albopictus* εντοπίστηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα στην Κέρκυρα και στη Θεσπρωτία το 2003 και το 2004 αντίστοιχα (Samanidou-Voyadjoglou et al., 2005). Έχει καταγραφεί και σε άλλες περιοχές της Ελλάδας,

όπως η Κεντρική Μακεδονία, η Πελοπόννησος, η Αττική και η Κρήτη (Giatropoulos et al., 2012a; Giatropoulos et al., 2012b). Μελέτες επιτήρησης δείχνουν ότι το έντομο έχει εγκατασταθεί στην Αττική (στην κεντρική Μακεδονία, στη Θράκη, στη Θεσσαλία και στην Πελοπόννησο (Para et al., 2016). Το 2014 και το 2015 εντοπίστηκε για πρώτη φορά στην Κρήτη και στη Λέσβο, αντίστοιχα (Patsoula et al., 2017), υποδηλώνοντας τη γεωγραφική του επέκταση σχεδόν σε όλη την Ελλάδα (βλέπε ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1).

Η αποψίλωση των δασών, η επέκταση της άρδευσης και η εγκατάσταση των ανθρώπων σε νέες περιοχές έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση των τεχνητών εστιών που παρέχουν διάφορους τύπους οικοτόπων για την αναπαραγωγή κουνουπιών (Amusan et al., 2005; McIntyre, 2000). Η πληθώρα των τεχνητών εστιών αναπαραγωγής σε συνδυασμό με την υψηλή ικανότητα προσαρμογής σε διαφορετικά κλίματα μέσω της παραγωγής ανθεκτικών ωών σε κρύες και ξηρές συνθήκες (Medlock et al., 2012) ευνόησαν τον αποικισμό νέων περιοχών από το *Ae. albopictus*.

Η ανάπτυξη των ανήλικων επηρεάζει σημαντικά τη βιολογία και τη συμπεριφορά των ενηλίκων. Ποικίλες μεταβολές στο περιβάλλον όπως η θερμοκρασία, η πυκνότητα του πληθυσμού, η διαθεσιμότητα τροφής και η παρουσία τοξινών επηρεάζουν τον χρόνο ανάπτυξης των προνυμφών, την αποθήκευση των συστατικών, το μέγεθος των ενηλίκων, την ανοσία τους στους ιούς καθώς και την αναπαραγωγική ικανότητα των κουνουπιών (Alto et al., 2008; Alto et al., 2008; Alto et al., 2012; Briedgel et al., 1990; Dodson et al., 2011; Dodson et al., 2012; Levi et al., 2014; Mitchell-Foster et al., 2012; Muturi et al., 2012; Sumanochitrapon, 1998).

Σε μελέτες των Mitchell-Foster & συν. (2012) και Alto & συν. (2012) οι προνύμφες του *Aedes aegypti* και του *Culex pipiens* που εκτράφηκαν σε συνθήκες διατροφικής καταπόνησης είχαν μειωμένο μέγεθος ως ενήλικα και μειωμένο αριθμό και μέγεθος ωών. Άλλες μελέτες βρήκαν ότι η ποσότητα της τροφής στο προνυμφικό στάδιο επηρεάζει τη διάρκεια ανάπτυξης των νυμφών (Levi et al., 2014; Mitchell-Foster et al., 2012). Σε μελέτη των Yadav & συν. (2017) προέκυψε πως η επιβίωση των ενηλίκων του *Ae. albopictus* καθώς και άλλως ειδών κουνουπιών (*Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* και

Anopheles stephensi) μειώθηκε με την αύξηση της πυκνότητας των προνυμφών. Έρευνα των Manorenjitha και συν. (2012) έδειξε πως η διατροφή των προνυμφών του *Ae. albopictus* με διαφορετικές ποσότητες τροφής επηρέασε σημαντικά την ανάπτυξή τους με παράγοντες όπως ο υπερπληθυσμός και η μειωμένη ποσότητα τροφής να παρατείνει τη διάρκεια ανάπτυξης των ανήλικων σταδίων έως και 36 ημέρες.

Επίσης, οι Sumanochitrapon & συν. (1998) βρήκαν ότι πληθυσμοί κουνουπιών του *Ae. aegypti* είναι λιγότερο πιθανό να μολυνθούν από τον ιό του δάγκειου πυρετού σε συνθήκες συνωστισμού και περιορισμένων θρεπτικών συστατικών όπως και σε συνθήκες χαμηλής πυκνότητας και επάρκειας θρεπτικών συστατικών. Ωστόσο, το αντίθετο φάνηκε σε μελέτη του Alto & συν. (2008), δηλαδή η διπλάσια αύξηση του συνωστισμού σε προνύμφες του *Ae. aegypti* και του *Ae. albopictus* οδήγησε σε σημαντική αύξηση (περισσότερο από 60%) της μόλυνσης και της μετάδοσης του δάγκειου πυρετού.

Παράμετροι όπως είναι η ποσότητα τροφής και ο συνωστισμός που έχουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των προνυμφών και στα χαρακτηριστικά των ενηλίκων. Οι συγκεκριμένες παράμετροι προωθούν ενδοειδικές αλληλεπιδράσεις που μπορεί να οδηγήσουν σε μειωμένη ανάπτυξη κουνουπιών, επιβίωση και μέγεθος ενηλίκων (Gimnig et al., 2002; Juliano et al., 2004; Loubinos, 2002). Επίσης, επηρεάζεται και η αναπαραγωγή των ενηλίκων από την ενδοειδική αλληλεπίδραση στα προνυμφικά στάδια (Clements, 1992), γεγονός που μπορεί να επηρεάσει τον βαθμό μετάδοσης μολυσματικών ασθενειών (Dwyer, 2000).

Το επίπεδο συνωστισμού και η δόση της τροφής επιδρούν σημαντικά στην ανάπτυξη των προνυμφών και στο μέγεθος των ενηλίκων. Κουνούπια του *Ae. albopictus* που εκτράφηκαν σε μέτρια πυκνότητα εμφάνισαν μακρύτερες πτέρυγες από τα αντίστοιχα ενήλικα που προέρχονταν από τη μεταχείριση χαμηλότερης πυκνότητας (Reinskid et al., 2009).

Η ύπαρξη μεγαλύτερων πτερύγων συνεπάγεται και αύξηση στο σώμα του κουνουπιού. Οι διαφορές στο μέγεθος του σώματος στα ενήλικα κουνούπια μπορεί να είναι σημαντικές από επιδημιολογική άποψη. Μεγαλόσωμα θηλυκά του *Ae. albopictus* λαμβάνουν περισσότερα γεύματα αίματος και από

περισσότερους ξενιστές σε σχέση με τα μικρόσωμα θηλυκά (Xue et al., 1995). Υπό φυσικές συνθήκες το μέγεθος των κουνουπιών μπορεί να επηρεάσει την επιβίωση και τη μακροβιότητά τους (Nasci, 1986). Αν και υπάρχουν δεδομένα που αφορούν τον ενδοειδικό ανταγωνισμό του *Ae. albopictus*, αυτά δεν εστιάζουν στην επίδραση του συνωστισμού και της ποσότητας τροφής.

Σκοπός του παρόντος κεφαλαίου ήταν να διερευνηθούν οι επιπτώσεις της ποσότητας τροφής και της πυκνότητας των προνυμφών στην επιβίωση και στη διάρκεια ανάπτυξης των ανηλίκων καθώς και στη μακροβιότητα των ενηλίκων και στο μέγεθος των πτερύγων του *Ae. albopictus*. Τα αποτελέσματα αναμένεται να συμβάλουν καθοριστικά στη δημιουργία μοντέλων πρόβλεψης της δυναμικής των πληθυσμών του *Ae. albopictus*.

3.3. Υλικά και Μέθοδοι

3.3.1 Εργαστηριακές συνθήκες

Τα πειράματα διεξήχθησαν στο Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό ελεγχόμενες συνθήκες περιβάλλοντος ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $65 \pm 5\%$ RH, 14:10 L:D). Η φωτόφαση ορίστηκε από τις 07:00 έως τις 21:00 με προοδευτική αύξηση της έντασης του φωτός την πρώτη ώρα και αντίστοιχη μείωση μία ώρα πριν από την αυγή και το σούρουπο. Ο φωτισμός προέρχονταν από λαμπτήρες φθορίου με ένταση από 800 έως 1000 Lux.

3.3.2 Έντομα και μέθοδοι εκτροφής

Χρησιμοποιήθηκε πληθυσμός του είδους *Ae. albopictus* από την περιοχή της Θεσσαλίας και τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στην F₂ και F₄ γενεά σε ταυτόσημες εργαστηριακές συνθήκες. Οι προνύμφες εκτρέφονταν σε λευκές, πλαστικές λεκάνες 42 x 30 x 10 cm πυκνότητας 2500 – 3000 άτομα ανά λεκάνη με 3L λίτρα νερού και επαρκή ποσότητα αλεσμένης γατοτροφής (Friskies Adult, Purina, Italy), οι νύμφες συλλέγονταν με πλαστικές πιπέτες τύπου Pasteur και μεταφέρονταν σε λευκά κυλινδρικά κύπελλα 500 ml μέσα σε κλωβούς εκτροφής BugDorm-4F2222 Insect Rearing Cage 32,5 x 32,5 x 32,5 cm και τα ενήλικα άτομα διατηρούνταν στους κλωβούς εκτροφής σε πυκνότητα 400-500 άτομα και τρέφονταν με υδατικό διάλυμα ζάχαρης 10% που ανανεώνονταν κάθε εβδομάδα (Ενότητα 2.2).

3.3.3 Επίδραση της πυκνότητας των προνυμφών και της ποσότητας τροφής στην ανάπτυξη και επιβίωση των ανήλικων σταδίων

Δύο ή τρεις ώρες μετά την εκκόλαψη, οι νεαρές προνύμφες μεταφέρθηκαν σε λευκούς, κυλινδρικούς κλωβούς (17 cm και ύψος 6 cm) με 1/lt εμφιαλωμένου νερού και συνωστισμό από 100, 300 και 600 προνύμφες/δοχείο. Όσον αφορά την τροφική επάρκεια, επιλέχθηκαν δύο ποσότητες (1 και 2 mg τροφής/προνύμφη αντίστοιχα). Η επιλογή των συγκεκριμένων ποσοτήτων βασίστηκε στα αποτελέσματα των Carrieri και συν. (2003) ο οποίος διαπίστωσε ότι χρησιμοποιώντας την ίδια ακριβώς ποσότητα τροφής σε αυτή τη δόση εμφανίζεται ενδογενής ανταγωνισμός στο *Ae. albopictus*.

Καθώς οι διατροφικές ανάγκες των προνυμφών αυξάνονται με την ηλικία για να αποφευχθεί η υπερφόρτωση του νερού με περίσσεια οργανικής ύλης, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της θνησιμότητας, η τροφή προστέθηκε διαδοχικά σε διάστημα 6 ημερών με βάση χρονικό πλαίσιο. Τις δύο πρώτες ημέρες προστέθηκε το 5% της συνολικής ποσότητας τροφής, την τρίτη 10% περισσότερο, την τέταρτη 20% και τις δύο τελευταίες ημέρες το υπόλοιπο 60% αντίστοιχα.

Το ποσοστό τροφής από τη συνολική ποσότητα προέκυψε από πειράματα που έδειξαν ότι αφενός οι προνύμφες έχουν επάρκεια τροφής και αφετέρου η ποιότητα και η διαφάνεια του νερού παραμένει σταθερή. Πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις σε κυλινδρικά δοχεία του 1lt.

Όλα τα κυλινδρικά δοχεία καλύπτονταν συνεχώς με καπάκια που είχαν 5 οπές διαμέτρου 3 χιλιοστών το καθένα για να εξασφαλιστεί επαρκής αερισμός κατά τη διάρκεια των βιοδοκιμών. Τα δοχεία επιθεωρούνταν καθημερινά για την ύπαρξη νυμφών. Οι συλλεγόμενες νύμφες τοποθετούνταν σε διαφανή δοχεία με καπάκι τα οποία περιείχαν 200ml νερό, με συνωστισμό 10 έως 15 νύμφες ανά δοχείο. Οι νύμφες παρέμεναν στα δοχεία μέχρι την ενηλικίωσή τους.

3.3.4 Επίδραση της πυκνότητας των προνυμφών και της ποσότητας τροφής στη μακροβιότητα και στο μέγεθος των ενηλίκων

Με την ενηλικίωση των κουνουπιών, ένα αρσενικό και ένα θηλυκό, μεταφέρονταν σε μεμονωμένους κλωβούς ώστε να σχηματιστούν ζεύγη. Κάθε κλωβός ενηλίκων περιλάμβανε ένα διαφανές πλαστικό κύπελλο χωρητικότητας 400 mL που τοποθετήθηκε ανεστραμμένο και στερεώθηκε στο καπάκι ενός τρυβλίου Petri διαμέτρου 9 cm. Ένα πλαϊνό παράθυρο (3 cm x 5 cm) χρησίμευε για αερισμό, ενώ μια μικρή οπή στο επάνω μέρος του κλωβού παρείχε την είσοδο στο κλωβό. Τροφή στα ενήλικα (διάλυμα ζάχαρης 5%) παρέχονταν από ένα βαμβακερό φυτίλι που περνούσε από τη βάση του κλωβού στην κάτω βάση του τρυβλίου Petri. Το διάλυμα σακχαρόζης ανανεωνόταν μία φορά την εβδομάδα. Οι θάνατοι καταγραφόταν καθημερινά μέχρι το θάνατο του τελευταίου ατόμου.

Σαράντα ζεύγη ενηλίκων χρησιμοποιήθηκαν για κάθε μία από τις παραπάνω μεταχειρίσεις. Αρσενικά και θηλυκά που προήλθαν από τις διαφορετικές μεταχειρίσεις, θανατώθηκαν σε υδατινό διάλυμα 80% αιθανόλης και η δεξιά πτέρυγα του κάθε ατόμου αφαιρέθηκε χρησιμοποιώντας νυστέρι και λαβίδα. Κάθε δείγμα φωτογραφήθηκε με ψηφιακή κάμερα και η συνολική επιφάνεια από τη δεξιά πτέρυγα υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Image J. Αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε 27 – 30 φορές για

κάθε μεταχείριση (συνωστισμός, ποσότητα τροφής) και φύλο.

3.4 Στατιστική ανάλυση

Πραγματοποιήθηκαν περιγραφική και επαγωγική στατιστική ανάλυση χι τετράγωνο (χ^2). Οι ποιοτικές μεταβλητές αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χι τετράγωνο (χ^2). Η κανονική κατανομή των ποσοτικών μεταβλητών επαληθεύτηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία Shapiro-Wilk. Για τις συγκρίσεις των ομάδων χρησιμοποιήθηκαν οι δοκιμασίες ANOVA και *t*-test για συγκρίσεις ομάδων. Η επίδραση του συνωστισμού και της ποσότητας τροφής στην επιβίωση και στην περίοδο ανάπτυξης των προνυμφών και των νυμφών καθώς και η επίδραση του συνωστισμού των προνυμφών, της ποσότητας τροφής και του φύλου στα ενήλικα ελέγχθηκε με το πρότυπο ανάλογων κινδύνων του Cox (Cox proportional hazards model). Χρησιμοποιήθηκαν γενικευμένα γραμμικά μοντέλα (Generalised Linear Model - GLMs) για την επίδραση του συνωστισμού των προνυμφών, της ποσότητας τροφής και του φύλου στο μέγεθος των πτερύγων. Οι καμπύλες Kaplan-Meier χρησιμοποιήθηκαν για να αποτυπωθεί η επιβίωση. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο SPSS 25 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3.5 Αποτελέσματα

3.5.1 Επιβίωση και διάρκεια ανάπτυξης των ανήλικων σταδίων

Επιβίωση προνυμφών

Η ποσότητα τροφής επηρέασε την επιβίωση των προνυμφών σε κάθε επίπεδο συνωστισμού. Για ποσότητα τροφής 1mg η επιβίωση διέφερε σημαντικά μεταξύ των διαφόρων επιπέδων συνωστισμού ($\chi^2=92,173$, $p < 0,001$). Ομοίως για ποσότητα τροφής 2 mg η επιβίωση διέφερε σημαντικά μεταξύ των διαφόρων υπο-ομάδων συνωστισμού, με τις διαφορές να είναι ακόμα μεγαλύτερες σε σχέση με εκείνες στην ποσότητα του 1 mg ($\chi^2=233,229$, $p < 0,001$). Η επιβίωση και στις δύο ποσότητες τροφής ήταν υψηλότερη στον ενδιάμεσο συνωστισμό. Πιο συγκεκριμένα, για επιβίωση για ποσότητα τροφής

1 mg το ποσοστό επιβίωσης ήταν 80,11% ενώ για ποσότητα τροφής 2 mg το ποσοστό επιβίωσης ήταν 90,38%. Η επιβίωση για χαμηλό και μέτριο επίπεδο συνωστισμού ήταν μεγαλύτερη στην υψηλότερη ποσότητα τροφής, ενώ το αντίθετο συνέβη στην υψηλή ποσότητα τροφής (Πίνακας 3.1).

Η ανάλυση της λογιστικής παλινδρόμησης ανέδειξε τον συνωστισμό των προνυμφών ως σημαντικό παράγοντα πρόβλεψης της διάρκειας ζωής των προνυμφών (νύμφωση) ($p = 0,015$). Τόσο η ποσότητα τροφής όσο και η αλληλεπίδραση μεταξύ του συνωστισμού των προνυμφών και της ποσότητας τροφής δεν είχαν σημαντική επίδραση ($p > 0,05$) (Πίνακας 3.2).

Πίνακας 3.1 Επίδραση της ποσότητας τροφής και του συνωστισμού στην επιβίωση των προνυμφών του *Aedes albopictus*

	Ποσοστό επιβίωσης (%)				
Συνωστισμός	Ποσότητα τροφής				
Προνύμφες/ 1 lt νερό	1mg	2mg	χ^2	df	p
100	66,00 ^α	77,00 ^α	6,325	1	0,012
300	80,11 ^β	90,38 ^β	12,036	1	0,001
600	61,83 ^γ	57,36 ^γ	5,826	1	0,016
χ^2	92,173	233,229			
df	2	2			
p	<0,001	<0,001			

Στην ίδια στήλη και στην ίδια ποσότητα τροφής, οι τιμές που συνοδεύονται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (pairwise comparisons, post hoc χ^2 test, $p < 0,05$)

Πίνακας 3.2 Λογιστική παλινδρόμηση για την επίδραση του συνωστισμού και της ποσότητας τροφής στην επιβίωση των προνυμφών (νύμφες) του *Aedes albopictus*

Πηγή παραλλακτικότητας	$\beta \pm SE$	$\text{Exp}(\beta)$	p
Συνωστισμός προνυμφών (300)	$1,109 \pm 0,458$	3,032	0,015
Ποσότητα τροφής (1mg)	$-0,643 \pm 0,411$	0,526	0,118
Συνωστισμός προνυμφών x Ποσότητα τροφής	$0,001 \pm 0,002$	0,673	0,673

Διάρκεια ανάπτυξης προνυμφών

Η μεγαλύτερη διάρκεια ανάπτυξης και στις δύο ποσότητες τροφής αναφέρθηκε στο χαμηλότερο επίπεδο συνωστισμού. Πιο συγκεκριμένα, στο 1mg η διάρκεια ανάπτυξης για συνωστισμό 100 προνύμφες/1lt νερού ήταν περίπου 12 ημέρες ενώ για συνωστισμό 300 και 600 προνύμφες/ 1lt νερού ήταν 11 και 10 ημέρες αντίστοιχα. Στα 2 mg και για συνωστισμό 100 προνύμφες/1 lt νερού η διάρκεια ανάπτυξης ήταν περίπου 9 ημέρες ενώ για συνωστισμό 300 και 600 προνύμφες/ 1lt νερού ήταν 8 ημέρες. Ανεξάρτητα από την ποσότητα τροφής, η διάρκεια ανάπτυξης των προνυμφών ήταν σημαντικά μακρύτερη στο χαμηλότερο επίπεδο συνωστισμού ($p < 0,001$) (Πίνακας 3.3) (Βλ. και αντίστοιχη ανάλυση διακύμανσης στο παράρτημα II).

Το μοντέλο ανάλογων κινδύνων του Cox έδειξε ότι ο συνωστισμός των προνυμφών, η ποσότητα τροφής καθώς και η αλληλεπίδρασή τους είναι σημαντικοί προγνωστικοί παράγοντες της διάρκειας ανάπτυξης του προνυμφικού σταδίου (χρόνος έως τη νύμφωση) ($p < 0,001$) (Πίνακας 3.4). Όταν η ανάλυση έγινε για το κάθε επίπεδο συνωστισμού ξεχωριστά, επιβεβαιώθηκε ότι διάρκεια ανάπτυξης ήταν μακρότερη στο μικρότερο επίπεδο συνωστισμού (Πίνακας 3.5).

Πίνακας 3.3 Επίδραση της ποσότητας τροφής και του συνωστισμού στη διάρκεια ανάπτυξης (χρόνος μέχρι τη νύμφωση) των προνυμφών του *Aedes albopictus*

Ποσότητα τροφής	Συνωστισμός (Προνύμφες/ 1lt νερό)	Διάρκεια ανάπτυξης (ημέρες $\pm$ SE)			
		Μέσος όρος	Τεταρτημόρια		
			25	50	75
1 mg	100 (n=198)	12,3 $\pm$ 4,3 ^α	16,0 $\pm$ 0,5	10,0 $\pm$ 0,2	9,00 $\pm$ 0,1
	300 (n=721)	10,9 $\pm$ 5,6 ^{αβ}	11,0 $\pm$ 0,3	9,0 $\pm$ 0,1	8,00 $\pm$ 0,1
	600 (n=1113)	10,0 $\pm$ 4,4 ^β	10,0 $\pm$ 0,1	9,0 $\pm$ 0,0	8,00 $\pm$ 0,0
2 mg	100 (n=228)	9,6 $\pm$ 2,1 ^α	10,0 $\pm$ 0,1	9,0 $\pm$ 0,1	8,0 $\pm$ 0,0
	300 (n=777)	8,5 $\pm$ 1,4 ^β	9,0 $\pm$ 0,1	8,0 $\pm$ 0,0	8,0 $\pm$ 0,0
	600 (n=1040)	8,6 $\pm$ 1,1 ^β	9,0 $\pm$ 0,1	9,0 $\pm$ 0,0	8,0 $\pm$ 0,1

Στην ίδια στήλη και στην ίδια ποσότητα τροφής, οι τιμές που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (pairwise comparisons, log rank test, $p > 0,05$)

Πίνακας 3.4 Μεταβλητές του μοντέλου ανάλογων κινδύνων του Cox για την επίδραση του συνωστισμού, της ποσότητας τροφής και της αλληλεπίδρασής τους στη διάρκεια ανάπτυξης των προνυμφών του *Aedes albopictus*

Πηγή παραλλακτικότητας	$\beta \pm SE$	Exp(β)	p
Συνωστισμός προνυμφών	0,002 $\pm$ 0,000	1,002	<0,001
Ποσότητα τροφής	0,772 $\pm$ 0,081	2,163	<0,001
Συνωστισμός προνυμφών x Ποσότητα τροφής	-0,001 $\pm$ 0,000	0,999	<0,001

β εκτιμώμενοι συντελεστές στο μοντέλο ανάλογων κινδύνων του Cox

Πίνακας 3.5 Μεταβλητές του μοντέλου ανάλογων κινδύνων του Cox για τη διάρκεια ανάπτυξης των προνυμφών του *Aedes albopictus* για ποσότητα τροφής 1, 2 mg

Πηγή παραλλακτικότητας		$\beta \pm SE$	$Exp(\beta)$	p
Ποσότητα τροφής	Συνωστισμός (Προνύμφες/1 lt νερό)			
1 mg	100	0,509 $\pm$ 0,078	1,664	<0,001
	300	0,208 $\pm$ 0,048	1,231	<0,001
	600 (ομάδα αναφοράς)			
2 mg	100	0,405 0,075	1,499	<0,001
	300	-0,111 0,048	0,895	0,021
	600 (ομάδα αναφοράς)			

β εκτιμώμενοι συντελεστές στο μοντέλο παλινδρόμησης ανάλογων κινδύνων του Cox

Επιβίωση νυμφών

Η ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης έδειξε ότι ο συνωστισμός των προνυμφών, η ποσότητα τροφής και η αλληλεπίδρασή τους δεν ήταν σημαντικοί προγνωστικοί παράγοντες για την επιβίωση των νυμφών (Πίνακας 3.6). Συγκρίνοντας την επιβίωση των νυμφών σε κάθε ποσότητα τροφής δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές. Ομοίως, σε κάθε επίπεδο συνωστισμού, η ποσότητα τροφής δεν επηρέασε την επιβίωση των νυμφών (Πίνακας 3.7).

Η ποσότητα τροφής δεν επηρέασε την επιβίωση των νυμφών σε κανένα επίπεδο συνωστισμού. Για ποσότητα τροφής 1mg η επιβίωση δε διέφερε μεταξύ των διαφόρων επιπέδων συνωστισμού ($\chi^2=0,100$, $p=0,951$). Ομοίως για ποσότητα τροφής 2 mg ($\chi^2=1,141$, $p=0,565$) (Πίνακας 3.7).

Για τα ίδια επίπεδα συνωστισμού δε διαπιστώθηκαν διαφορές στην επιβίωση ανάλογα με την ποσότητα τροφής. Συγκεκριμένα, η επιβίωση στο 1mg για συνωστισμό 100 προνύμφες/1 lt ήταν 99,45% ενώ στα 2 mg ήταν 100% ($\chi^2=0,005$, $p=0,945$). Η επιβίωση (% ποσοστό επιβίωσης) στις 300 νύμφες/1lt νερό στο 1mg ήταν 99,44% ενώ στο 2mg ήταν 99,49%, ενώ στις

600 νύμφες/lt νερό ήταν στο 1mg 99,55% ενώ στο 2 mg 99,52%. Για συνωστισμό 300 και 600 νύμφες/lt νερού δεν υπήρξε διαφορά στην επιβίωση μεταξύ 1 mg και 2 mg ποσότητας τροφής ($\chi^2 < 0,001$, $p=1$ και $\chi^2 < 0,001$, $p=1$) αντίστοιχα (Πίνακας 3.7).

Πίνακας 3.6 Λογιστική παλινδρόμηση για την επιβίωση των νυμφών του *Aedes albopictus*

Πηγή παραλλακτικότητας	$\beta \pm SE$	$\text{Exp}(\beta)$	p
Συνωστισμός νυμφών (300)	$0,937 \pm 1,327$	0,499	0,480
Ποσότητα τροφής (2mg)	$0,913 \pm 1,342$	0,462	0,496
Συνωστισμός προνυμφών x ποσότητα τροφής	$0,002 \pm 0,003$	0,410	0,522

β εκτιμώμενοι συντελεστές στο μοντέλο παλινδρόμησης ανάλογων κινδύνων του Cox

Πίνακας 3.7 Επιβίωση νυμφών του *Aedes albopictus* από προνύμφες που τράφηκαν σε διαφορετικές ποσότητες τροφής και πυκνότητες

Συνωστισμός (Προνύμφες/ 1lt νερό)	Ποσοστό επιβίωσης %				
	Ποσότητα τροφής		χ^2	df	p
	1mg	2mg			
100	99,45 ^a	100,00 ^a	0,005	1	<0,945
300	99,44 ^a	99,49 ^a	<0,001	1	1,000
600	99,55 ^a	99,52 ^a	<0,001	1	1,000
χ^2	0,100	1,141			
df	2	2			
p	0,951	0,565			

Ποσοστά σε κάθε στήλη που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους (Post hoc pairwise χ^2 test, χ^2).

Περίοδος ανάπτυξης νυμφών

Ανεξάρτητα από την ποσότητα τροφής, η μικρότερη διάρκεια ανάπτυξης αναφέρθηκε στο ενδιάμεσο επίπεδο συνωστισμού (Πίνακας 3.8). Το μοντέλο ανάλογων κινδύνων του Cox ανέδειξε το συνωστισμό των νυμφών και την αλληλεπίδρασή του με την ποσότητα τροφής ως ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες ανάπτυξης των νυμφών ($p < 0,001$ και $p = 0,012$ αντίστοιχα) ενώ η ποσότητα τροφής δεν ήταν σημαντικός παράγοντας για την διάρκεια ανάπτυξης των νυμφών (χρόνος έως την εμφάνιση των ενηλίκων) (Πίνακας 3.9). Όταν μελετήθηκε περαιτέρω η επίδραση του συνωστισμού ανά ποσότητα τροφής στη διάρκεια ανάπτυξης των νυμφών βρέθηκε ότι στο επίπεδο συνωστισμού 300 προνύμφες / 1 lt και ποσότητα τροφής 1 mg η περίοδος ανάπτυξης των νυμφών μειώθηκε σημαντικά ($p < 0,001$) (Πίνακας 3.10).

Πίνακας 3.8 Επίδραση της πυκνότητας προνυμφών και ποσότητας τροφής στην διάρκεια ανάπτυξης των νυμφών του *Aedes albopictus*

Ποσότητα τροφής	Συνωστισμός (Προνύμφες/ 1lt νερό)	Διάρκεια ανάπτυξης (ημέρες $\pm$ SE)			
		Μέσος όρος	Τεταρτημόρια		
			25	50	75
1 mg	100 (n=187)	2,6 $\pm$ 0,0 ^α	3,0 $\pm$ 0,0	3,0 $\pm$ 0,3	2,0 $\pm$ 0,0
	300 (n=718)	2,5 $\pm$ 0,0 ^β	3,0 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,0	2,0 $\pm$ 0,0
	600 (n=1040)	2,7 $\pm$ 0,2 ^γ	3,0 $\pm$ 0,1	3,0 $\pm$ 0,0	2,0 $\pm$ 0,0
2 mg	100 (n=213)	2,6 $\pm$ 0,0 ^α	3,0 $\pm$ 0,0	3,0 $\pm$ 0,0	2,0 $\pm$ 0,0
	300 (n=754)	2,5 $\pm$ 0,0 ^β	3,0 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,0	2,0 $\pm$ 0,0
	600 (n=1036)	2,6 $\pm$ 0,0 ^α	3,0 $\pm$ 0,0	3,0 $\pm$ 0,0	2,0 $\pm$ 0,0

Οι τιμές που συνοδεύονται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά ($p < 0,05$, t - test)

Πίνακας 3.9 Μεταβλητές του μοντέλου ανάλογων κινδύνων του Cox για επιβίωση νυμφών του *Aedes albopictus*

Πηγή παραλακτικότητας	$\beta \pm SE$	$\text{Exp}(\beta)$	p
Συνωστισμός προνυμφών	-0,245 $\pm$ 0,075	0,782	<0,001
Ποσότητα τροφής	-0,183 $\pm$ 0,116	0,833	0,117
Συνωστισμός προνυμφών x Ποσότητα τροφής	0,117 $\pm$ 0,047	1,124	0,012

β εκτιμώμενοι συντελεστές στο μοντέλο παλινδρόμησης ανάλογων κινδύνων του Cox

Πίνακας 3.10 Μεταβλητές του μοντέλου ανάλογων κινδύνων του Cox για τη διάρκεια ανάπτυξης των νυμφών του *Aedes albopictus* για ποσότητα τροφής 1, 2 mg

Πηγή παραλλακτικότητας		$\beta \pm SE$	$\text{Exp}(\beta)$	p
Ποσότητα τροφής	Συνωστισμός (Προνύμφες/1lt νερό)			
1 mg	100	-0,095 ± 0,077	0,910	0,216
	300	-0,236 ± 0,050	0,790	<0,001
	600 (ομάδα αναφοράς)			
2 mg	100	-0,036 ± 0,073	0,965	0,621
	300	-0,080 ± 0,048	0,923	0,097
	600 (ομάδα αναφοράς)			

β εκτιμώμενοι συντελεστές στο μοντέλο παλινδρόμησης ανάλογων κινδύνων του Cox

3.5.2 Επιβίωση και διάρκεια ανάπτυξης των ενηλίκων

Μακροβιότητα και μέγεθος ενηλίκων

Στους Πίνακες 3.11, 3.12 δίνεται η διάρκεια ζωής σε σχέση με την επίδραση του συνωστισμού των προνυμφών και της ποσότητας τροφής για τα ενήλικα αρσενικά και τα θηλυκά του *Ae. albopictus*. Η διάρκεια ζωής των αρσενικών για ποσότητα τροφής 1 mg σε κάθε επίπεδο συνωστισμού ήταν παραπλήσια ($p > 0,05$) ενώ για ποσότητα τροφής 2 mg ήταν μεγαλύτερη για συνωστισμό προνυμφών 100 προνύμφες /1 lt σε σχέση με συνωστισμό 300 και 600 προνύμφες /1 lt αντίστοιχα (log rank test, $p < 0,05$). Στο ίδιο επίπεδο συνωστισμού, δεν παρατηρήθηκε διαφορά ανεξάρτητα με την ποσότητα της τροφής εκτός από τα αρσενικά σε επίπεδο συνωστισμού 300 προνύμφες/lt: Τα αρσενικά που προήλθαν από τη διατροφή των προνυμφών από 1 mg τροφής ήταν μακροβιότερα από αυτά που προήλθαν από τη διατροφή των προνυμφών με 2 mg τροφής ($p=0,03$) (Πίνακας 3.11). Η μακροβιότητα των θηλυκών ήταν μεγαλύτερη από αυτή των αρσενικών στο ίδιο επίπεδο συνωστισμού και στην ίδια δόση τροφής ($p<0,001$) ενώ Στο ίδιο επίπεδο συνωστισμού, δεν παρατηρήθηκε διαφορά άσχετα με την ποσότητα της τροφής (Πίνακας 3.12).

Το μοντέλο ανάλογων κινδύνων του Cox έδειξε ότι ο συνωστισμός των προνυμφών καθώς και το φύλο ήταν σημαντικοί προγνωστικοί παράγοντες μακροβιότητας των ενηλίκων. Η ποσότητα της τροφής και όλες οι αλληλεπιδράσεις δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (Πίνακας 3.13). Το μοντέλο ανάλογων κινδύνων του Cox έδειξε πως τόσο στα ενήλικα αρσενικά όσο και στα θηλυκά ο συνωστισμός των προνυμφών, η ποσότητα τροφής καθώς και η αλληλεπίδρασή τους δεν είχαν σημαντική συσχέτιση με την επιβίωση (Πίνακας 3.14).

Πίνακας 3.11 Επίδραση της ποσότητας τροφής και του συνωστισμού των προνυμφών στη μακροβιότητα αρσενικών του *Aedes albopictus*

Ποσότητα τροφής	Συνωστισμός (Προνύμφες/ 1lt νερό)	Διάρκεια ζωής (ημέρες ± SE)			
		Μέσος όρος	Τεταρτημόρια		
			25	50	75
1 mg					
	100 (n=40)	48,7 ± 16,6 ^α	59,0 ± 3,7	47,0 ± 5,1	35,0 ± 1,4
	300* (n=40)	47,1 ± 22,9 ^α	58,0 ± 8,1	44,0 ± 3,8	36,0 ± 3,9
	600 (n=40)	43,7 ± 17,9 ^α	53,0 ± 4,1	45,0 ± 1,6	33,0 ± 6,2
2 mg					
	100 (n=40)	52,4 ± 20,1 ^{βγ}	64,0 ± 4,1	54,0 ± 7,0	39,0 ± 2,8
	300* (n=40)	37,2 ± 15,4 ^{βδ}	44,0 ± 2,0	36,0 ± 2,1	29,0 ± 4,1
	600 (n=40)	37,8 ± 15,0 ^{γδ}	43,0 ± 1,9	36,0 ± 2,1	28,0 ± 2,3

Στην ίδια στήλη και στην ίδια ποσότητα τροφής, οι τιμές που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (pairwise comparisons, log rank test, $p > 0.05$) ενώ οι τιμές που συνοδεύονται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (log rank, $p < 0,05$). * Διαφορά στατιστικά σημαντική (Independent samples t - test, $p = 0,003$)

Πίνακας 3.12 Επίδραση της ποσότητας τροφής και του συνωστισμού των προνυμφών στη μακροβιότητα των θηλυκών του *Aedes albopictus*

Ποσότητα τροφής	Συνωστισμός (Προνύμφες/ 1lt νερό)	Διάρκεια ζωής (ημέρες ± SE)			
		Μέσος όρος	Τεταρτημόρια		
			25	50	75
1 mg					
	100 (n=40)	86,4 ± 21,9 ^α	103,0 ± 3,3	84,0 ± 5,5	74,0 ± 4,4
	300 (n=40)	74,6 ± 27,2 ^α	90,0 ± 3,4	77,0 ± 1,6	59,0 ± 7,3
	600 (n=40)	76,8 ± 24,6 ^α	92,0 ± 5,5	80,0 ± 4,7	56,0 ± 1,0
2 mg					
	100 (n=40)	84,6 ± 20,5 ^α	97,0 ± 2,3	87,0 ± 2,4	71,0 ± 3,3
	300 (n=40)	80,8 ± 18,6 ^α	91,0 ± 2,1	81,0 ± 2,5	70,0 ± 2,8
	600 (n=40)	73,0 ± 26,2 ^α	89,0 ± 3,7	75,0 ± 6,3	55,0 ± 6,0

Στην ίδια στήλη και στην ίδια ποσότητα τροφής, οι τιμές που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (pairwise comparisons, log rank test, $p > 0.05$) ενώ οι τιμές που συνοδεύονται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (Anova, Bonferroni, t - test).

Πίνακας 3.13 Μεταβλητές του μοντέλου ανάλογων κινδύνων του Cox για τον συνωστισμό προνυμφών, την ποσότητα τροφής και το φύλο στη μακροβιότητα των ενηλίκων του *Aedes albopictus*

Πηγή παραλλακτικότητας	$\beta \pm SE$	$\text{Exp}(\beta)$	p
Συνωστισμός προνυμφών	0,001 $\pm$ 0,253	0,554	0,020
Ποσότητα τροφής	0,281 $\pm$ 0,138	0,777	0,068
Φύλο	1,212 $\pm$ 0,146	5,119	<0,001
Συνωστισμός προνυμφών x Ποσότητα τροφής	0,001 $\pm$ 0,000	1,001	0,163
Συνωστισμός προνυμφών x Φύλο	-0,001 $\pm$ 0,000	0,999	0,185
Ποσότητα τροφής x Φύλο	-0,202 $\pm$ 0,184	0,817	0,271

β εκτιμώμενοι συντελεστές στο μοντέλο παλινδρόμησης ανάλογων κινδύνων του Cox

Πίνακας 3.14 Μεταβλητές του μοντέλου ανάλογων κινδύνων του Cox για συνωστισμό προνυμφών και ποσότητα τροφής στη μακροβιότητα των αρσενικών και των θηλυκών του *Aedes albopictus*.

Πηγή Παραλλακτικότητας	$\beta \pm SE$	$\text{Exp}(\beta)$	p
Αρσενικά			
Συνωστισμός προνυμφών	-0,001 $\pm$ 0,001	0,999	0,482
Ποσότητα τροφής	-0,126 $\pm$ 0,244	0,881	0,605
Συνωστισμός προνυμφών x Ποσότητα τροφής	0,001 $\pm$ 0,001	1,001	0,068
Θηλυκά			
Συνωστισμός προνυμφών	0,000 $\pm$ 0,001	1,000	0,631
Ποσότητα τροφής	0,057 $\pm$ 0,244	1,059	0,815
Συνωστισμός προνυμφών x Ποσότητα τροφής	0,000 $\pm$ 0,001	1,000	0,894

β εκτιμώμενοι συντελεστές στο μοντέλο παλινδρόμησης ανάλογων κινδύνων του Cox

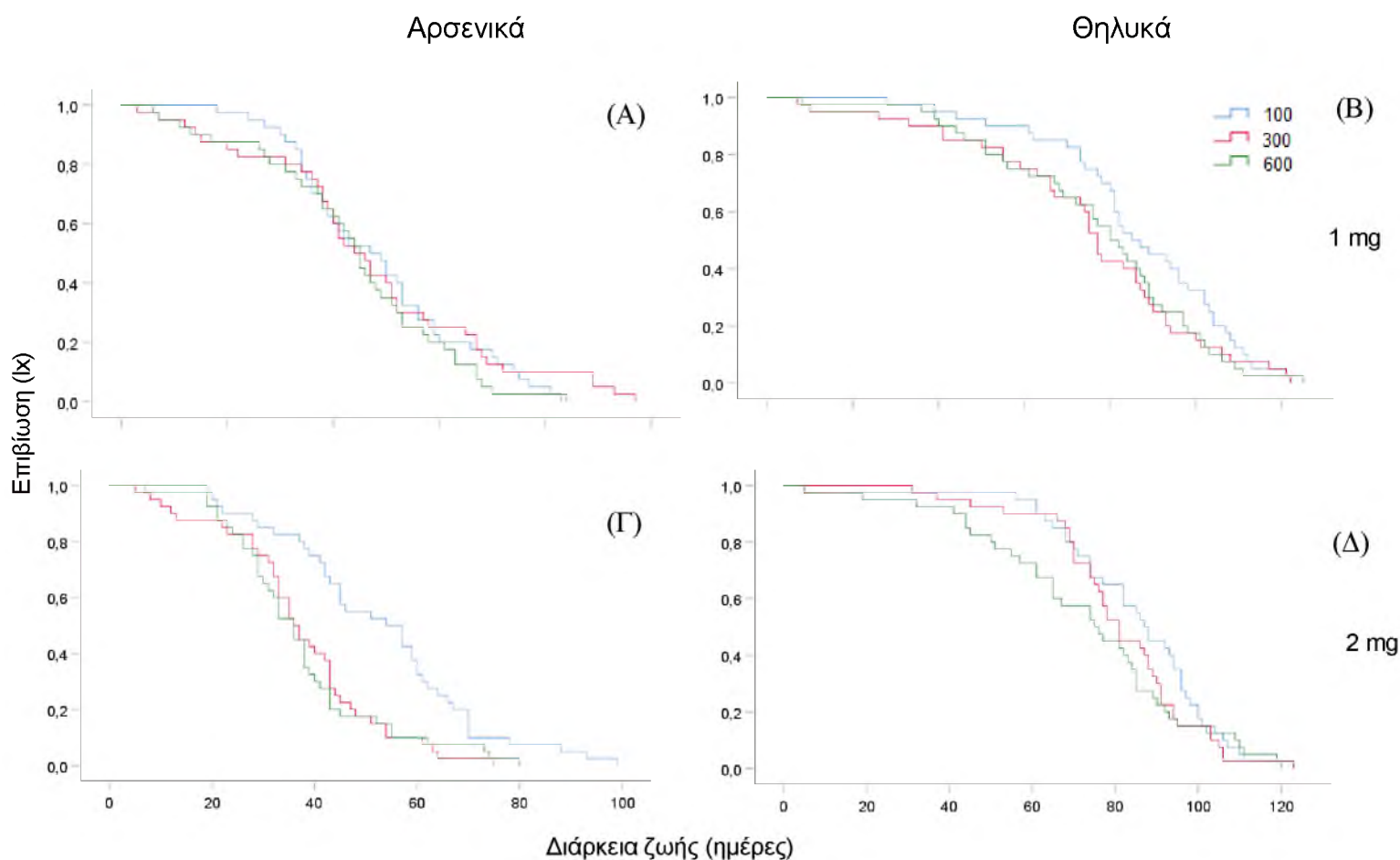
Στο Διάγραμμα 3.1 απεικονίζεται η επιβίωση των ενηλίκων αρσενικών και θηλυκών που προέκυψαν από εκτροφή των προνυμφών σε τρία επίπεδα συνωστισμού (100, 300, 600 προνύμφες/1 lt) και σε δύο ποσότητες τροφής, (Α) και (Β) για 1 mg και (Γ) και (Δ) για 2 mg. Η πορεία των ενηλίκων αρσενικών και θηλυκών ήταν παρόμοια και στα δύο φύλα. Η θνησιμότητα στα αρσενικά για ποσότητα τροφής 1, 2 mg σε όλα τα επίπεδα συνωστισμού ως την ηλικία των 20 ημερών ήταν αρκετά χαμηλή <10%. Έκτοτε, για ποσότητα τροφής 1 mg παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της θνησιμότητας με αποτέλεσμα το 50% των αρσενικών να πεθάνουν έως και τις 57 ημέρες. Για ποσότητα τροφής 2 mg και σε συνωστισμό 100 προνύμφες / 1 lt νερού μέχρι την ηλικία των 60 ημερών πεθαίνει το 50% των αρσενικών ενώ στα υπόλοιπα επίπεδα συνωστισμού το ίδιο ποσοστό θνησιμότητας συμβαίνει μέχρι την ηλικία των 40 ημερών. Το δε 80% των αρσενικών για ποσότητα τροφής 1 mg είχαν πεθάνει έως και την ηλικία των 77 ημερών.

Για ποσότητα τροφής 2 mg σε συνωστισμό 100 προνύμφες / 1 lt νερού πεθαίνει το 80% των αρσενικών μέχρι την ηλικία των 77 ημερών ενώ στα υπόλοιπα επίπεδα συνωστισμού το ίδιο ποσοστό θνησιμότητας συμβαίνει μέχρι την ηλικία των 50 ημερών. Για ποσότητα τροφής 1 mg και σε κάθε επίπεδο συνωστισμού (100, 300, 600 προνύμφες / 1 lt νερού) η μακροβιότητα των αρσενικών ήταν 84, 97 και 83 ημέρες αντίστοιχα ενώ για ποσότητα τροφής 2 mg στα ίδια επίπεδα συνωστισμού η μακροβιότητα των αρσενικών ήταν 99, 75 και 80 ημέρες αντίστοιχα.

Η θνησιμότητα στα θηλυκά για ποσότητα τροφής 1 mg και συνωστισμό 100 προνύμφες / 1 lt νερού ως την ηλικία των 60 ημερών ήταν αρκετά χαμηλή <10%, ενώ στα υπόλοιπα επίπεδα συνωστισμού έχουμε ο ίδιο ποσοστό θνησιμότητας μέχρι την ηλικία των 40 ημερών. Για ποσότητα τροφής 2 mg και συνωστισμό 100, 300 προνύμφες / 1 lt νερού το 10% της θνησιμότητας έφτασε έως και τις 65 ημέρες περίπου ενώ για συνωστισμό 600 προνύμφες / 1 lt νερού τις 40 ημέρες. Έκτοτε, για ποσότητα τροφής 1 mg παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της θνησιμότητας με αποτέλεσμα το 50% των θηλυκών να είχαν πεθάνει έως και τις 95 ημέρες για συνωστισμό 100 προνύμφες / 1 lt νερού ενώ στα υπόλοιπα επίπεδα συνωστισμού η προαναφερθείσα θνησιμότητα φτάνει έως και τις 85 ημέρες.

Για ποσότητα τροφής 2 mg και συνωστισμό 100 προνύμφες / 1 lt νερού μέχρι την ηλικία των 90 ημερών είχε πεθάνει το 50% των θηλυκών ενώ στα υπόλοιπα επίπεδα συνωστισμού το ίδιο ποσοστό θνησιμότητας συναντάται στην ηλικία των 80 ημερών. Το δε 80% των θηλυκών για ποσότητα τροφής 1 mg είχαν πεθάνει έως και την ηλικία των 110 ημερών ενώ στα υπόλοιπα επίπεδα συνωστισμού έχουμε το ίδιο επίπεδο θνησιμότητας έως και την ηλικία των 100 ημερών. Για ποσότητα τροφής 2 mg σε συνωστισμό 100 προνύμφες / 1 lt νερού είχε πεθάνει το 80% των αρσενικών μέχρι την ηλικία των 100 ημερών ενώ στα υπόλοιπα επίπεδα συνωστισμού το ίδιο ποσοστό θνησιμότητας συνέβη μέχρι την ηλικία των 90 ημερών. Για ποσότητα τροφής 1 mg και σε κάθε επίπεδο συνωστισμού (100, 300, 600 προνύμφες / 1 lt νερού) η μακροβιότητα των θηλυκών ήταν 122, 122 και 125 ημέρες αντίστοιχα ενώ για ποσότητα τροφής 2 mg στα ίδια επίπεδα συνωστισμού η μακροβιότητα των αρσενικών

ήταν 123, 123 και 120 ημέρες αντίστοιχα.



Διάγραμμα 3.1 Αθροιστικές καμπύλες επιβίωσης ενηλίκων που προέκυψαν από εκτροφή των προνυμφών σε τρία επίπεδα συνωστισμού (100, 300, 600 προνύμφες/1 lt) και σε δύο ποσότητες τροφής, (Α) και (Β) για 1 mg και (Γ) και (Δ) για 2 mg για αρσενικά και θηλυκά αντίστοιχα.

3.6 Μέγεθος ενηλίκων

Εφαρμόστηκε ένα μοντέλο παλινδρόμησης για την πρόβλεψη της επιφάνειας των πτερυγών με ψευδομεταβλητές. Ο συνωστισμός, η ποσότητα τροφής και το φύλο ήταν ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες της επιφάνειας της δεξιάς πτέρυγας. Η μεγαλύτερη επιφάνεια πτερυγών αφορούσε τα αρσενικά, την ποσότητα τροφής 2mg/προνύμφη και τον συνωστισμό ($N=300/1\text{lt}$ νερό). Το μοντέλο εξήγησε το 85% της μεταβλητότητας της εξαρτημένης

μεταβλητής (άριστη προσαρμογή). Όταν η επιφάνεια της πτέρυγας εξετάστηκε ξεχωριστά στα αρσενικά και στα θηλυκά, ο συνωστισμός και η τροφή αναδείχθηκαν ως σημαντικοί προγνωστικοί παράγοντες στα θηλυκά ($p=0.006$ & $p<0.001$ αντίστοιχα), ενώ στα αρσενικά μόνο η τροφή ($p < 0,001$).

Το μέγεθος των πτερύγων στα αρσενικά δεν παρουσίασε διαφορές σε καμία ποσότητα τροφής και σε κανένα επίπεδο συνωστισμού ($p > 0,05$). Στα θηλυκά, το μέγεθος των πτερύγων ήταν μεγαλύτερο για ποσότητα τροφής 1 mg και συνωστισμό 300 προνύμφες / 1 lt ($p < 0,05$). Το μέγεθος των πτερύγων των θηλυκών σε σχέση με τα αρσενικά ήταν μεγαλύτερο για κάθε ποσότητα τροφής 1, 2 mg και σε κάθε επίπεδο συνωστισμού ($p < 0,05$) (Πίνακας 3.15). Ο συνωστισμός με 300 προνύμφες /1 lt, η ποσότητα τροφής 1 mg και το φύλο είχαν σημαντική επίδραση στην επιφάνεια της πτέρυγας των ενηλίκων του *Ae. albopictus* (Πίνακας 3.16). Η ποσότητα τροφής 1 mg για τα αρσενικά και ο συνωστισμός στις 300 προνύμφες /1 lt και η ποσότητα τροφής 1 mg είχαν σημαντική επίδραση στην επιφάνεια της πτέρυγας των ενηλίκων αρσενικών και θηλυκών του *Aedes albopictus* (Πίνακας 3.17).

Πίνακας 3.15 Συγκριτική παρουσίαση του μέσου όρου της επιφάνειας της πτέρυγας των θηλυκών και αρσενικών *Aedes albopictus*, σε συνάρτηση με το συνωστισμό των προνυμφών και τη δόση τροφής

Μέσος όρος επιφάνειας πτερύγων (mm ² ± SE)					
	<u>Αρσενικά</u>		<u>Θηλυκά</u>		
Ποσότητα τροφής	Συνωστισμός	(Προνύμφες/ 1lt νερό)	Συνωστισμός	(Προνύμφες/ 1lt νερό)	<i>p</i>
1 mg					
	100 (n=30)	1,767 ± 0,003 ^α	100 (n=30)	2,240 ± 0,026 ^α	<0,001
	300 (n=30)	1,784 ± 0,004 ^α	300 (n=27)	2,196 ± 0,022 ^β	<0,001
	600 (n=30)	1,813 ± 0,003 ^α	600 (n=29)	2,293 ± 0,019 ^α	<0,001
2 mg					
	100 (n=30)	1,903 ± 0,003 ^β	100 (n=29)	2,476 ± 0,025 ^α	<0,001
	300 (n=29)	1,926 ± 0,002 ^β	300 (n=30)	2,422 ± 0,019 ^α	<0,001
	600 (n=30)	1,910 ± 0,003 ^β	600 (n=30)	2,445 ± 0,022 ^α	<0,001

Στην ίδια στήλη και στην ίδια ποσότητα τροφής, οι τιμές που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (pairwise comparisons, log rank test, $p>0.05$).

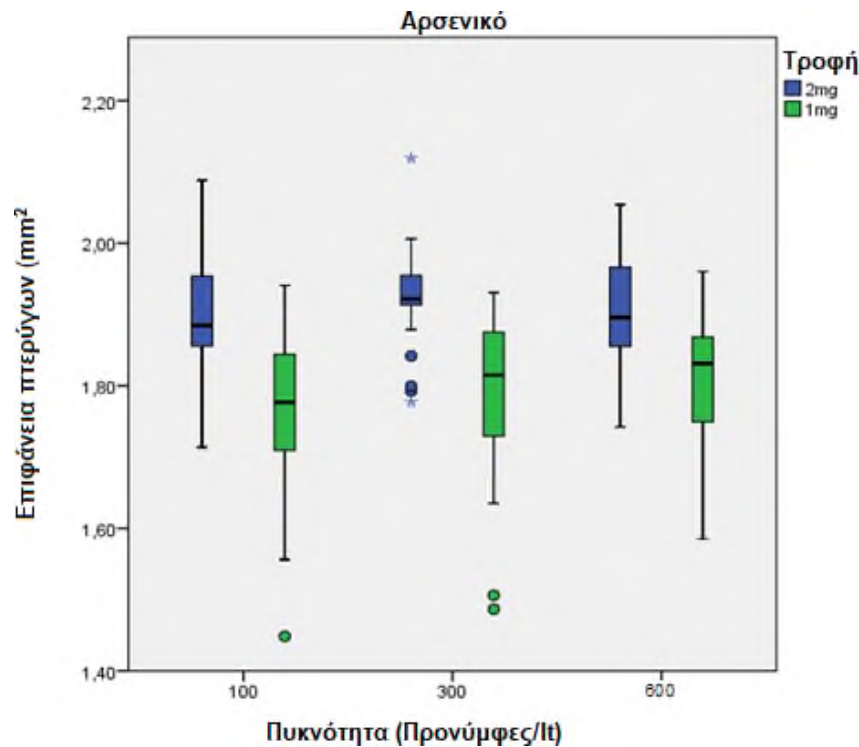
Πίνακας 3.16 Γενικευμένο γραμμικό μοντέλο για την επίδραση του συνωστισμού των προνυμφών, της ποσότητας τροφής και του φύλου στην επιφάνεια της πτέρυγας των ενηλίκων του *Aedes albopictus*

	Μεταβλητή	β	Wald χ^2 **	Exp(β)	p
Συνωστισμός (Προνύμφες / 1lt νερό)					
	100	-0,020	1,984	0,980	0,159
	300	-0,033	5,353	0,967	0,021
	600 (ομάδα αναφοράς)			1	
Ποσότητα τροφής					
	1mg	-0,164	196,459	0,849	<0,001
	2mg (ομάδα αναφοράς)			1	
Φύλο					
	Αρσενικό	-0,495	1790,023	0,609	<0,001
**df=1	Θηλυκό(ομάδα αναφοράς)				

Πίνακας 3.17 Γενικευμένο γραμμικό μοντέλο για την επίδραση του συνωστισμού των προνυμφών και της ποσότητας τροφής στην επιφάνεια της πτέρυγας των ενηλίκων αρσενικών και θηλυκών του *Aedes albopictus*

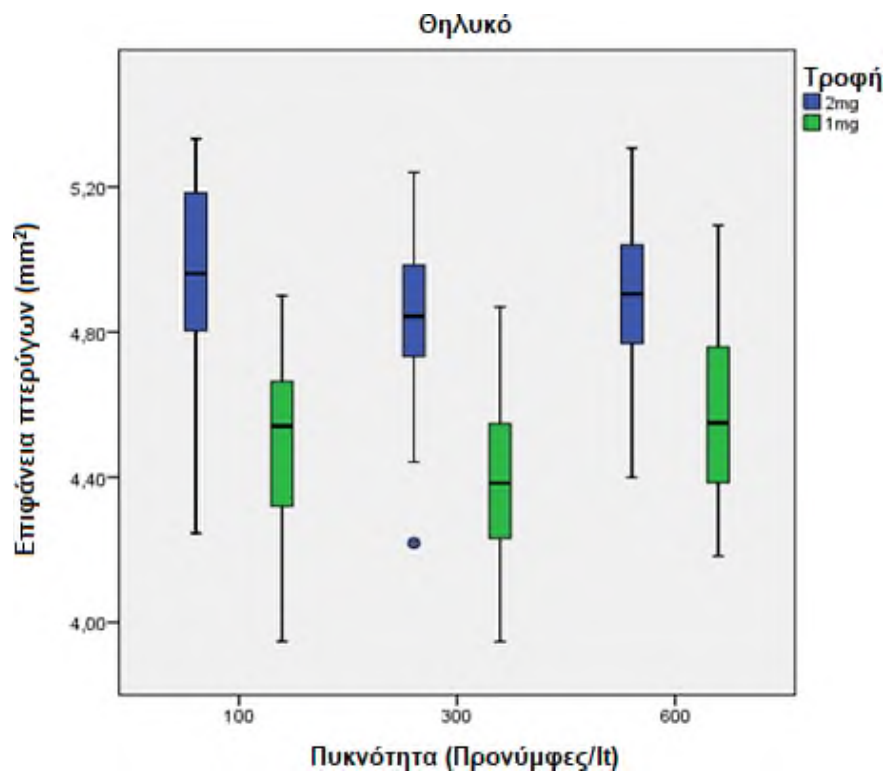
Μεταβλητή	β	Wald χ^2_{**}	Exp(β)	p
Αρσενικά				
Συνωστισμός (Προνύμφες/1lt νερό)				
100	-0,028	2,678	0,973	0,102
300	-0,007	0,174	0,993	0,677
600 (ομάδα αναφοράς)				
Ποσότητα τροφής				
1mg	-0,125	81,813	0,882	<0,001
2mg (ομάδα αναφοράς)				
Θηλυκά				
Συνωστισμός (Προνύμφες/1lt νερό)				
100	-0,012	0,272	0,989	0,602
300	-0,061	7,489	0,941	0,006
600 (ομάδα αναφοράς)				
Ποσότητα τροφής				
1mg	-0,205	126,441	0,815	<0,001
2mg (ομάδα αναφοράς)				
**df=1				

Στο Διάγραμμα 3.2 απεικονίζεται η επιφάνεια των πτερύγων στα αρσενικά σε σχέση με την ποσότητα της τροφής και την πυκνότητα των προνυμφών στο *Aedes albopictus*. Η ποσότητα τροφής αυξάνει το μέγεθος των πτερύγων ($p < 0,005$) σε κάθε επίπεδο πυκνότητας.



Διάγραμμα 3.2 Η επιφάνεια της δεξιάς πτέρυγας των αρσενικών του *Aedes albopictus* σε σχέση με την ποσότητα τροφής και τον συνωστισμό

Στο Διάγραμμα 3.3 απεικονίζεται η επιφάνεια των πτερυγών στα θηλυκά σε σχέση με την ποσότητα της τροφής και την πυκνότητα των προνυμφών στο *Aedes albopictus*. Η ποσότητα τροφής αυξάνει το μέγεθος των πτερυγών ($p < 0,005$) σε κάθε επίπεδο πυκνότητας.



Διάγραμμα 3.3 Η επιφάνεια της πτέρυγας των θηλυκών *Aedes albopictus* σε σχέση με την ποσότητα τροφής και την πυκνότητα

3.7 Συζήτηση

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του παρόντος κεφαλαίου η αύξηση της τροφής αύξησε την επιβίωση των προνυμφών στις συγκεντρώσεις των 100 και 300 προνυμφών / 1 lt ενώ τη μείωσε ελαφρά στη συγκέντρωση των 600 προνυμφών / 1 lt. Η επιβίωση των προνυμφών και στις δύο ποσότητες τροφής κορυφώθηκε στο ενδιάμεσο επίπεδο συνωστισμού (300 προνύμφες / 1 lt). Σχετικά με την περίοδο ανάπτυξης των προνυμφών (χρόνος έως τη νύμφωση), αυτή μειώθηκε με την αύξηση του συνωστισμού και στα δύο επίπεδα τροφής. Εξαίρεση αποτέλεσε ο συνδυασμός του υψηλότερου συνωστισμού και της [113]

υψηλότερης ποσότητας τροφής όπου και παρατηρήθηκε αυξήθηκε ελαφρά αύξηση της περιόδου ανάπτυξης. Όσον αφορά στην περίοδο ανάπτυξης των νυμφών, αυτή ήταν μεγαλύτερη στο υψηλότερο επίπεδο συνωστισμού ανεξαρτήτως ποσότητας τροφής. Σε αντίθεση με τις προνύμφες η επιβίωση των νυμφών ήταν υψηλότερη στο μικρότερο επίπεδο συνωστισμού για τη μεγαλύτερη ποσότητα τροφής (600 προνύμφες / 1 lt 2 mg). Η μακροβιότητα στα ενήλικα θηλυκά ήταν περίπου 30 ημέρες μακρύτερη σε σχέση με τα αρσενικά στο ίδιο επίπεδο συνωστισμού και για την ίδια δόση τροφής. Τα θηλυκά είχαν σημαντικά μεγαλύτερο μέγεθος πτερύγων από τα αρσενικά σε κάθε επίπεδο συνωστισμού προνυμφών και σε ποσότητα τροφής. Στο ίδιο φύλο το μέγεθος το μέγεθος των πτερύγων ήταν σημαντικά μεγαλύτερο στα 2mg ανεξαρτήτου του επιπέδου συνωστισμού. Ειδικότερα στα θηλυκά το μέγεθος των πτερύγων ήταν σημαντικά μικρότερο στο επίπεδο συνωστισμού 300 προνύμφες/ 1 lt και σε ποσότητα τροφής 1 mg.

Προνύμφες

Στις προνύμφες η ποσότητα της τροφής και η πυκνότητα των προνυμφών επηρεάζει το ποσοστό επιβίωσης και την διάρκεια ανάπτυξής τους γεγονός που αναφέρεται και σε άλλες έρευνες (Manorenjitha et al., 2012; Yadav et al., 2017). Ωστόσο η επιβίωση των προνυμφών στην πυκνότητα των 300 προνύμφες / 1 lt είναι σημαντικά υψηλότερη και στις δύο ποσότητες τροφής γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τα ευρήματα των Yadav και συν. (2012) όπου η επιβίωση μειώθηκε με την αύξηση του συνωστισμού. Επίσης, η επιβίωση ήταν υψηλότερη και σε σχέση με τις έρευνες των Yadav και συν. (2017) και Manorenjitha και συν. (2012). Ειδικότερα, σε έρευνα των Yadav και συν. (2017) σε πέντε διαφορετικές πυκνότητες προνυμφών σε τέσσερα είδη κουνουπιών (*Ae. albopictus*, *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus*, *An. Stephensi*) και με καθημερινή προσθήκη 15 mg μαγιάς σε σκόνη η επιβίωση μειώθηκε με την αύξηση της πυκνότητας των προνυμφών με τα *Aedes* να παρουσιάζουν σχεδόν ταυτόσημο αλλά σημαντικά υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη. Σε έρευνα των Manorenjitha και συν. (2012) ήταν σημαντική η αναλογία νύμφωσης των προνυμφών που είχαν τραφεί υπό φυσιολογικές και υπό συνθήκες λοιμού στις πυκνότητες των 200 με 500

προνύμφες / 400 ml νερού. Η αναλογία θνησιμότητας στις προνύμφες που είχαν τραφεί σε συνθήκες λοιμού στη μέγιστη πυκνότητα (500 προνύμφες / 400 ml νερό) ήταν πάνω από το 70%.

Η διατροφή που ακολουθήθηκε στην παρούσα έρευνα προσιδιάζει συνθήκες λιμού που είναι από 35 (2 mg) έως 80 (1 mg) φορές λιγότερη από τις αντίστοιχες μελέτες (Yadav et al., 2017, Manorenjitha et al., 2012). Επελέγησαν αυτές οι ποσότητες τροφής ως προσομοίωση με τις φυσικές συνθήκες όπου κυριαρχεί η έλλειψη τροφής.

Ο χρόνος ανάπτυξης μέχρι τη νύμφωση ήταν μεγαλύτερος σε όλες τις πυκνότητες στην ποσότητα τροφής με 1 mg σχέση με 2 mg αλλά μειωμένος από την πυκνότητα των 100 προνυμφών/1 lt νερού μέχρι την πυκνότητα των 300 προνυμφών / 1lt νερού, εύρημα που έρχεται σε αντίθεση με τους Yadav και συν. (2017). Η περίοδος ανάπτυξης των προνυμφών ήταν παρόμοια και για τα τέσσερα είδη, παρατηρήθηκε μείωση της περιόδου ανάπτυξης με την αύξηση της πυκνότητας μέχρι το μέσο επίπεδο ενώ σε υψηλότερες πυκνότητες η περίοδος ανάπτυξης αυξάνεται ελαφρά. Σε όλες τις πυκνότητες το *Ae. albopictus* χρειάστηκε 11-17 ημέρες ενώ το *Ae. aegypti* 13-20 ημέρες. Το *An. strephensi* και το *Cx. quinquefasciatus* είχαν τη μεγαλύτερη περίοδο ανάπτυξης ($23 \pm 0,577$ ημέρες) και ($19,33 \pm 1,333$ ημέρες) αντίστοιχα, στην πυκνότητα των 150 προνυμφών/ 200 ml νερού. Συνεπώς, η πυκνότητα των προνυμφών συνδέεται σημαντικά με το χρόνο ανάπτυξης.

Αυτό πιθανώς συμβαίνει καθώς όσο αυξάνεται η πυκνότητα των προνυμφών μειώνεται ο χρόνος μέχρι τη νύμφωση εξαιτίας του ενδοειδικού ανταγωνισμού, ειδικά σε συνθήκες περιορισμένης διατροφικής επάρκειας. Συνεπώς, η άριστη πυκνότητα βρίσκεται στις 300 προνυμφες / 1 lt καθώς στις 100 προνύμφες / 1 lt υπάρχει μεν επάρκεια τροφής αλλά τα αποσυντεθειμένα κουνούπια είναι λιγοστά, οπότε δεν προστίθεται πτωματογενής ποσότητα στο σύστημα. Με την αύξηση του συνωστισμού των προνυμφών, παρατηρείται εξάντληση των θρεπτικών ουσιών και απελευθέρωση διαφόρων τοξικών αποβλήτων από άτομα στο περιβάλλον ώστε να ξεπεραστεί ο ενδοειδικός ανταγωνισμός (Rogers et al., 2002; Seifert & Barrera, 1981; Shaman et al., 2002), ο οποίος ευνοεί τη θνησιμότητα των προνυμφών. Φαίνεται ότι το θολό νερό λόγω των αποβλήτων των προνυμφών ευνοεί την ανάπτυξη βακτηρίων τα

οποία μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά τις προνύμφες των κουνουπιών και έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της διάχυσης οξυγόνου στην επιφάνεια του νερού (Wijeyaratne et al., 1975). Συνεπώς, στις 300 προνύμφες/ 1 lt υπάρχει η άριστη ισορροπία τοξινών και πτωματογενούς τροφής ή/και εκδυμάτων των προνυμφών ενώ στις 600 προνύμφες / 1 lt νερού η ισορροπία αυτή λειτουργεί θετικά για τις τοξίνες. Στην έρευνα των Yadav και συν. (2017) παρατηρήθηκε μείωση της περιόδου ανάπτυξης με την αύξηση της πυκνότητας μέχρι το μέσο επίπεδο ενώ σε υψηλότερες πυκνότητες η περίοδος ανάπτυξης αυξάνεται ελαφρά. Συνεπώς, η πυκνότητα των προνυμφών συνδέεται σημαντικά με το χρόνο ανάπτυξης. Σε έρευνα των Manorenjitha και συν. (2012) διαπιστώθηκε η επίδραση της διατροφής και του υπερπληθυσμού στην ανάπτυξη των προνυμφών του *Ae. albopictus*. Ο υπερπληθυσμός και η έλλειψη τροφής παρέτειναν σημαντικά την ανάπτυξη των προνυμφών έως και 36 ημέρες. Στην έρευνα των Manorenjitha και συν. (2012) ο υπερπληθυσμός και η έλλειψη τροφής των προνυμφών είχαν επιζήμια επίδραση στην ανάπτυξη των προνυμφών όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες (Beach et al., 1977; Mori, 1979) και στη θνησιμότητα (Hien, 1975; Mori & Wada, 1978).

Σε μελέτη αναφέρθηκε θετική σχέση του χρόνου ανάπτυξης και της πυκνότητας των προνυμφών, ωστόσο σε υψηλότερες πυκνότητες, διαπιστώνονται παράγοντες μείωσης της ανάπτυξης ή παρατεταμένο χρονικό διάστημα ανάπτυξης (Ikeshoji, & Mulla, 1970). Ο Clements (1992) αναφέρει πως οι προνύμφες των κουνουπιών που αναπτύσσονται σε εστίες ανάπτυξης υποβάλλονται σε μεγάλες περιόδους έλλειψης τροφής με συνέπεια να παρατείνουν σημαντικά την περίοδο ανάπτυξής τους (Roy, 1931).

Σημαντική διαφορά με τις προαναφερθείσες μελέτες είναι πως η τροφή στη συγκεκριμένη μελέτη προστίθεται σταδιακά κατά την ανάπτυξη των προνυμφών, συνεπώς το νερό παρέμενε καθαρό αφού η τροφή καταναλώνονταν από τις προνύμφες.

Νύμφες

Όσον αφορά την επίδραση συνωστισμού των προνυμφών και της ποσότητας τροφής στην επιβίωση και στην περίοδο ανάπτυξης των νυμφών δεν υπάρχουν αρκετά επιστημονικά δεδομένα προς σύγκριση. Η ποσότητα

τροφής και η πυκνότητα των προνυμφών επηρεάζει το ποσοστό επιβίωσης των νυμφών καθώς και την περίοδο ανάπτυξής τους. Η επιβίωση των νυμφών είναι μεγαλύτερη στο μικρότερο επίπεδο συνωστισμού και σχεδόν όμοια στα υπόλοιπα. Επίσης, μειώνεται στο επίπεδο συνωστισμού 300 προνύμφες / 1lt και στις δύο ποσότητες τροφής.

Ενήλικα

Στα ενήλικα το φύλο και ο συνωστισμός των προνυμφών επηρεάζουν τη μακροβιότητά τους. Τα ευρήματα παρουσιάζουν αποκλίσεις και ταυτίσεις με εκείνα των Χue και συν. (2010) αλλά δεν μπορεί να γίνει πλήρης συσχέτιση καθώς στην έρευνά τους δεν είναι σαφής η ποσότητα τροφής των προνυμφών. Ειδικότερα, στην παρούσα έρευνα η διάρκεια ζωής των θηλυκών ανεξαρτήτως ποσότητας τροφής είναι σημαντικά μεγαλύτερη και εκείνη των αρσενικών και το συγκεκριμένο εύρημα ταυτίζεται εκείνο των Χue και συν. (2010). Στα θηλυκά η ποσότητα τροφής δεν επηρεάζει τη μακροβιότητα ενώ στα αρσενικά παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά σε επίπεδο συνωστισμού 300 προνύμφες / 1lt νερού όπου τα αρσενικά με ποσότητα τροφής 1 mg έζησαν περισσότερο από εκείνα με 2 mg. Ακόμη, στα αρσενικά η διάρκεια ζωής στο μικρότερο επίπεδο συνωστισμού για 2 mg ποσότητας τροφής διαφέρει σημαντικά σε σχέση με τα υψηλότερα επίπεδα συνωστισμού ενώ στα θηλυκά δεν παρατηρείται ανάλογο γεγονός.

Στην παρούσα έρευνα το μέγεθος των πτερύγων είχε σημαντικές διαφορές τόσο μεταξύ των φύλων όσο και στα διάφορα επίπεδα τροφής σε κάθε πυκνότητα για κάθε φύλο. Η ποσότητα της τροφής επηρέασε σημαντικά το μέγεθος των πτερύγων με θετική συσχέτιση στην διατροφή με 2 mg. Ο συνωστισμός επηρέασε μόνο τις πτέρυγες των θηλυκών στο επίπεδο των 300 προνυμφών/ 1 lt νερού. Οι Χue και συν. (2010) μελέτησαν το μήκος των πτερύγων και τη μακροβιότητα των ενηλίκων αρσενικών και θηλυκών του *Ae. albopictus* με βέλτιστη και υποβέλτιστη ποσότητα τροφής για την παραγωγή μεγάλωσμων και μικρόσωμων ενήλικων κουνουπιών.

Το μέγεθος του ενηλίκου κουνουπιού σύμφωνα με τον Lounibos (1994), είναι αποτέλεσμα της επίδρασης των συνθηκών τροφής και πυκνότητας στο

προनुμφικό στάδιο. Το μέγεθος στα αρσενικά σχετίζεται κυρίως με την επιβίωση και με την παραγωγή σπέρματος (Xue et al., 2010). Αντίθετα, στα θηλυκά οι Haramis (1985) και Nasci & Mitchell (1994) ανέφεραν θετική συσχέτιση μεταξύ του μεγέθους και της μακροβιότητάς η οποία συνδέεται και με τη μετάδοση ασθενειών. Επίσης, οι Armbruster & Hutchinson (2002) συσχέτισαν το μήκος των πτερύγων με τη μάζα της νύμφης και με τη γονιμότητα σε θηλυκά του *Ae. albopictus* και στο *Aedes (Finlaya) geniculatus* Olivier (1791).

Στην έρευνα των Xue και συν. (2010) ο συνωστισμός των προνυμφών στον βιότοπο προκάλεσε μεγαλύτερη περίοδο ανάπτυξης στο ανήλικό στάδιο και αυτό έχει ως αποτέλεσμα το μειωμένο βάρος των ενηλίκων (Bradshaw, Holzapfel, 1992; Hawley et al., 1985). Αυτή η μελέτη κατέληξε στο ότι ο βαθμός ενδοειδικού ανταγωνισμού είχε σημαντική επίδραση στα ενήλικα. Οι Walsh και συν. (2012) υπέθεσαν ότι για αυτήν την απόκλιση, υπάρχει μια αντιστάθμιση μεταξύ του ρυθμού ανάπτυξης των προνυμφών και του μεγέθους του σώματος. Οι προνύμφες που αναπτύσσονται πιο αργά μπορεί να έχουν την ευκαιρία να μεγαλώσουν γιατί όσο περνάει περισσότερος χρόνος, το δοχείο συσσωρεύει περισσότερη τροφή και με την πάροδο του χρόνου υπάρχει μεγάλη θνησιμότητα προνυμφών στα αρχικά στάδια, πολύ λίγες προνύμφες επιβιώνουν από τον ανταγωνισμό.

Τα υψηλά επίπεδα ενδο- ή δια-ειδικού ανταγωνισμού προνυμφών εμποδίζουν την ανάπτυξη των ενηλίκων, η οποία οδηγεί στην ενηλικίωση κουνουπιών με χαμηλότερο ανοσοποιητικό και συνεπώς πιο επιρρεπή στη λήψη και στη μετάδοση μολυσματικών ασθενειών. Η μετάδοση της νόσου απαιτεί την εγκατάσταση του ιού στο μεσαίο έντερο του κουνουπιού, διαδικασία όπου πολλά ανατομικά (π.χ. βασικές μεμβράνες) και φυσιολογικά (π.χ. παράγοντες ρύθμισης του ιού) συστήματα άμυνας μέσα στο κουνούπι πρέπει να καμφθούν από τον ιό (Ader, 2004; Woodring et al., 1996) ώστε να εγκατασταθεί και τελικά να διαδοθεί στον ξενιστή με το γεύμα αίματος. Οι φραγμοί στα παθογόνα είναι λιγότερο ισχυροί σε μικρόσωμα ενήλικα κουνούπια και έτσι γίνονται πιο ευαίσθητα σε ιογενείς λοιμώξεις (Ader, 2004; Woodring et al., 1996). Οι Grimstad και Walker (1991) παρατήρησαν διαφορές στη μορφολογία του μέσου εντέρου στο *Aedes triseriatus* με διαφορετικά μεγέθη

που εκτρέφονταν με διαφορετικές τροφές στο στάδιο της προνύμφης.

Τα μοντέλα μετάδοσης ασθενειών είναι ευαίσθητα σε αλλαγές στα δημογραφικά χαρακτηριστικά και στη μακροβιότητα των ενηλίκων, γεγονός που υποδηλώνει ότι ακόμη και μικρές αλλαγές στη μακροβιότητα των ενηλίκων που προκαλούνται από τον ανταγωνισμό των προνυμφών μπορεί να οδηγήσουν σε μεταβολές μετάδοσης των παθογόνων που προκαλούν μολυσματικές ασθένειες (Alto et al., 2008; Luz et al., 2003). Για τα προγράμματα καταπολέμησης κουνουπιών με την τεχνική των στερωμένων εντόμων (SIT) είναι απαραίτητη η παραγωγή στερωμένων εντόμων με την καλύτερη δυνατή αναλογία ποσότητας τροφής - κόστος παραγωγής καθώς τα αρσενικά θα έχουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής για σύζευξη και συνεπώς περισσότερες πιθανότητες ενώ σε περίπτωση που στον διαχωρισμό φύλου υπάρξει επιμόλυνση από θηλυκά θα υπάρχει μειωμένη πιθανότητα πρόσληψης και μετάδοσης κάποιου ιού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΓΕΥΜΑΤΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΣΥΖΕΥΞΗΣ ΣΤΑ ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ *Aedes albopictus*

4.1 Περίληψη

Το ασιατικό κουνούπι τίγρης, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) (Skuse, 1895) βρίσκεται σε περιαστικά περιβάλλοντα και είναι υπεύθυνο για τη μετάδοση ασθενειών όπως είναι ο ιός Ζίκα, ο chikungunya και ο δάγκειος πυρετός. Είναι ανθρωπόφιλο και λαμβάνει γεύμα αίματος κατά τη διάρκεια της ημέρας. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η επίδραση της σύζευξης στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων του *Ae. albopictus* καθώς και η επίδραση των γευμάτων αίματος στη διάρκεια ζωής και στην ωοτοκία των ενηλίκων θηλυκών. Για το *Ae. albopictus* με κανένα, ένα και με δύο γεύματα αίματος από άνθρωπο μελετήθηκαν τα δημογραφικά χαρακτηριστικά όπως η διάρκεια ζωής, η ωοπαραγωγή, ο αριθμός των νυμφών, το ποσοστό νύμφωσης, ο αριθμός ενηλίκων απογόνων (αρσενικών, θηλυκών) καθώς και η αναλογία φύλου αυτών. Ο πληθυσμός που χρησιμοποιήθηκε προέρχονταν από περιοχές της Θεσσαλίας και τα πειράματα διεξήχθησαν σε ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες, θερμοκρασία (25°C), υγρασία (65 ± 5% RH) και φωτοπερίοδο (14:10 L:D). Το φύλο, η σύζευξη και η αλληλεπίδραση φύλου – σύζευξης δεν είχαν σημαντική επίδραση στη διάρκεια ζωής ενώ το γεύμα αίματος ($p < 0,01$) και ο αριθμός αυτών επέδρασαν σημαντικά στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων. Ειδικότερα, φαίνεται πως τα δύο γεύματα αίματος επηρεάζουν σημαντικά τις δημογραφικές παραμέτρους των ενηλίκων του *Ae. albopictus*. Το γεύμα αίματος (ένα και πολλαπλά) μείωσε την διάρκεια ζωής των θηλυκών ενώ διπλασίασε την ωοπαραγωγή. Η γνώση της βιολογίας των κουνουπιών και δη

πως την επηρεάζουν τα γεύματα αίματος είναι πολύ σημαντική γιατί παρέχει τη βάση για την ανάπτυξη πληθυσμιακών μοντέλων με στόχο την ανάπτυξη αποτελεσματικών προγραμμάτων αντιμετώπισής τους.

4.2 Εισαγωγή

Τα τελευταία έτη εντείνεται η ανησυχία για τις ασθένειες που μεταδίδονται από τα κουνούπια (Krüger et al., 2014) (βλέπε Κεφάλαιο 1). Το *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skyse, 1985) (Diptera: Culicidae) είναι σημαντικός φορέας ασθενειών όπως ο δάγγειος, ο κίτρινος πυρετός, ο ιός Ζίκα, η ιαπωνική εγκεφαλίτιδα (Giatropoulos et al. 2012c; Kampen et al., 2013) και ζωνόσων όπως οι διροφιλαριάσεις (Giangaspero et al., 2013) και θεωρείται ένα από τα 100 είδη εισβολείς με τη μεγαλύτερη εξάπλωση παγκοσμίως (Giatropoulos et al., 2013). Για πολλά έτη το *Ae. albopictus* αποίκιζε την αφρικανική ήπειρο και τη Νοτιοανατολική Ασία, (Mousson et al., 2005; Scholte & Schaffner, 2007; Womack, 1993), αλλά σχετικά πρόσφατα εξαπλώθηκε σε ακόμη περισσότερες ηπείρους (Kraemer et al., 2015) με την αλλαγή του κλίματος και το εμπόριο να έχουν καθοριστική συμβολή στη διασπορά του (Becker et al., 2003).

Το *Ae. albopictus* υφίσταται καταπονήσεις μέχρι να προσαρμοστεί στα νέα περιβάλλοντα, καταπονήσεις που επηρεάζουν την μακροβιότητά του. Ταυτόχρονα όμως και η σύζευξη επηρεάζει τη φυσιολογία και τη συμπεριφορά όχι μόνο στο συγκεκριμένο είδος αλλά και σε αρκετά άλλα είδη κουνουπιών (Daniel and Kingsolver 1983; Ribeiro 1985; 2000). Για παράδειγμα, στο *Ae. aegypti* (συγγενικό είδος με το *Ae. albopictus*) η μεταφορά των πρωτεϊνών του αρσενικού βοηθητικού αδένου (του σπερματικού υγρού) στα θηλυκά κατά τη σύζευξη έχει επιδράσεις όπως να τα καθιστά μη δεκτικά σε επόμενες προσπάθειες σύζευξης (Craig, 1967; Degner & Harrington, 2016; Fucks et al., 1968; Fucks & Hiss, 1970; Gabrieli et al., 2014; Gwardz et al., 1971; Helsinki et al., 2012; Helsinki & Harrington, 2011), να αυξάνει την ωοτοκία (Freyvogel et al., 1968; Gillet, 1955; 1955; Hiss & Fucks, 1972; Judson, 1967; Klowden, 1993; Klowden & Chambers; 1991; Leahy & Craig, 1965; Ramalingam & Craig, 1976; Wallis & Lang, 1956;), να επιφέρει ακουστική εναρμόνιση με σκοπό την

ερωτοτροπία (League et al., 2019), να μειώνει τη δραστηριότητα πτήσης (Chiba et al., 1990; Chiba et al., 1992; Jones, 1981; Jones & Gubbins, 1978; 1979; Rowland 1989), να επηρεάζει την επιβίωση (Villarreal et al., 2018) και να προκαλεί ανοσιακές αποκρίσεις (Alfonso-Parra et al., 2016; Amaro et al., 2021).

Εκτός από τη σύζευξη στα κουνούπια και το γεύμα αίματος συνδέεται με την επικείμενη αναπαραγωγή (Roitberg et al., 1993) και η λήψη του έχει ένα κόστος καθώς το έντομο δαπανά ενέργεια που θα μπορούσε να κατανεμηθεί σε διαφορετική δραστηριότητα. Η αύξηση του αριθμού και του μεγέθους των γευμάτων αίματος έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση του βάρους και του αριθμού των ωών (Leishman et al., 2008). Σαφώς, στο πεδίο, μια αυξημένη συχνότητα γευμάτων αίματος απαιτεί επαφή με ξενιστή και κατά συνέπεια την έκθεση αυτών σε κίνδυνο μετάδοσης κάποιας νόσου. Συνεπώς, η κατανόηση της συμπεριφοράς του *Ae. albopictus* σε σχέση με τα γεύματα αίματος και με την προτίμηση των ξενιστών συμβάλει καθοριστικά στην καλύτερη αξιολόγηση του κινδύνου μετάδοσης παθογόνων, με αντίκτυπο στη δημόσια υγεία.

Σχετικά με την προτίμηση ξενιστή από το *Ae. albopictus* ορισμένοι ερευνητές το θεωρούν ανθρωπόφιλο (Bonizzoni et al., 2013; Egizi et al., 2013; Gratz, 2004) ενώ άλλοι ευκαιριακό ξενιστή του ανθρώπου (Bonizzoni et al., 2013; Lozano-Fuentes et al., 2019; Pereira-dos-Santos et al., 2020; Savage et al., 1993) ή και τα δύο συγχρόνως (Lombardo et al., 2017; Mogi et al., 2020). Για παράδειγμα, στην περιοχή La Reunion της Γαλλίας παρά την ευκαιριακή συμπεριφορά, το *Ae. albopictus* παρουσίασε προτίμηση στους ανθρώπους έναντι άλλων ξενιστών (Delatte et al., 2010), έρευνα που συμφωνεί και με άλλες, ανεξάρτητα από τις τοπικές περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. διαθεσιμότητα και αφθονία ξενιστών) (Kek et al., 2014; Sivan et al., 2015). Άλλες μελέτες επικεντρώθηκαν στις αλληλεπιδράσεις φορέα-ξενιστή και στην προτίμηση γεύματος αίματος σε αστικές και περι - αστιακές περιοχές (Pereira-dos-Santos et al., 2020) έναντι των αγροτικών όπου οι άνθρωποι είναι λιγότεροι.

Πιθανώς η προτίμηση ξενιστή μπορεί να επηρεάσει τη διατροφή και την βιολογία τους (Harrington et al., 2001). Ειδικότερα, μελέτες δείχνουν μεγαλύτερη αρμοστικότητα για τα κουνούπια όταν τρέφονται με θηλαστικά σε σχέση με πουλιά (Gubler et al., 1970; Xue et al., 2009). Ωστόσο, το *Ae.*

albopictus παρουσιάζει διατροφικές προτιμήσεις και μεταξύ των θηλαστικών. Ανάλογες προτιμήσεις συμβαίνουν και σε άλλα είδη κουνουπιών, όπως στο *Anopheles gambiae* που ενώ δεν αποκομίζει οφέλη από την αποκλειστική διατροφή με ανθρώπινο αίμα, δείχνει σαφή προτίμηση σ' αυτό (Lyimo et al., 2012).

Λιγοστές μελέτες ασχολήθηκαν με τη διαθεσιμότητα του ξενιστή και το γεύμα αίματος για το *Ae. albopictus* (Gomes et al., 2003; Richards et al., 2006). Λιγοστές είναι επίσης και οι μελέτες που ασχολήθηκαν εργαστηριακά με την επίδραση του γεύματος αίματος από διαφορετικούς ξενιστές στη μακροβιότητα, στην ωοπαραγωγή και στη γονιμότητα του *Ae. albopictus* (Fikrig et al., 2021).

Η επίδραση της θερμοκρασίας, της υγρασίας και της διάρκειας του φωτός μπορούν να επηρεάσουν τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των κουνουπιών (Grech et al., 2015; Li et al., 2014). Στο ενήλικο στάδιο οι προαναφερθείσες περιβαλλοντικές συνθήκες επηρεάζουν την μακροβιότητα, το αναπαραγωγικό δυναμικό (Afrane et al., 2007; Afrane et al., 2008; Alam et al., 2019; Dieng et al., 2010; Preechaporn et al., 2006; Yang et al., 2020) καθώς και τη γονιμότητα (Dieng et al., 2010; Leinsham et al., 2014; Suman et al., 2011). Σε πείραμα εργαστηρίου με γεύμα αίματος τρωκτικού οι Alam και Tuno (2019) παρατήρησαν πως η ζέστη και/ή υγρασία μείωσαν σημαντικά το αναπαραγωγικό δυναμικό. Σε εργαστηριακά πειράματα στην Ινδία αξιολογήθηκαν η επιβίωση και η γονιμότητα σε πληθυσμούς του *Ae. albopictus* στην έρημο (Jodhpur, Rajasthan) και σε παράκτιες περιοχές (Kolkata, West Bengal) με λήψη γεύμα αίματος από αίγα (De Souvik et al., 2022). Ωστόσο, δεν υπάρχει εργαστηριακή μελέτη που να αξιολογεί τα δημογραφικά χαρακτηριστικά του *Ae. albopictus* με κανένα, ένα και με πολλαπλά γεύματα αίματος.

Σκοπός του παρόντος κεφαλαίου είναι να διερευνηθεί η επίδραση της σύζευξης στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων (αρσενικών και θηλυκών) του *Ae. albopictus* καθώς και η επίδραση των γευμάτων αίματος στην ωοπαραγωγή τους σε σταθερές συνθήκες εκτροφής στο εργαστήριο.

4.3 Υλικά και μέθοδοι

4.3.1 Γενικά

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Π.Θ. από το φθινόπωρο του 2019 έως το καλοκαίρι του 2020. Οι πειραματικές συνθήκες ήταν σταθερές (25 ± 2 °C, σχετική υγρασία $65 \pm 5\%$ και φωτοπερίοδος 14:10 (Φ:Σ) και περιγράφονται στην Ενότητα 2.1. Χρησιμοποιήθηκαν λαμπτήρες φθορίου (day light type) με την ένταση στα εντομοδωμάτια να κυμαίνεται από 800 έως 1000 lux (Κεφάλαιο 2).

Χρησιμοποιήθηκε πληθυσμός του *Ae. albopictus* από την περιοχή της Θεσσαλίας και τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στην F2 και F4 γενεά με ταυτόσημες εργαστηριακές συνθήκες. Οι προνύμφες εκτρέφονταν σε λευκές, πλαστικές λεκάνες 42 x 30 x 10 cm πυκνότητας 2500 – 3000 άτομα ανά λεκάνη με 3L λίτρα νερού και επαρκή ποσότητα αλεσμένης γατοτροφής (Friskies Adult, Purina, Italy). Οι νύμφες συλλέγονταν με πλαστικές πιπέτες τύπου Pasteur και μεταφέρονταν σε λευκά κυλινδρικά κύπελλα 500 ml μέσα σε κλωβούς εκτροφής BugDorm-4F2222 Insect Rearing Cage 32,5 x 32,5 x 32,5 cm και τα ενήλικα άτομα διατηρούνταν στους κλωβούς εκτροφής σε πυκνότητα 400-500 άτομα και τρέφονταν με υδατικό διάλυμα ζάχαρης 10% που ανανεώνονταν κάθε εβδομάδα (Κεφάλαιο 2).

4.3.2 Επίδραση της σύζευξης στα δημογραφικά χαρακτηριστικά

Μελετήθηκε η διάρκεια ζωής των ενηλίκων των δύο φύλων με σύζευξη και χωρίς σύζευξη. Ειδικότερα, μεταφέρθηκαν 40 αρσενικές και 40 θηλυκές νύμφες (σύνολο 80) σε πλαστικό λευκό δοχείο με νερό 500ml σε κλωβό εκτροφής BugDorm-4F2222 Insect Rearing Cage 32,5 x 32,5 x 32,5 cm. Τα εξερχόμενα ενήλικα παρέμεναν στον κλωβό εκτροφής για 6 ημέρες με σκοπό τη σύζευξη και τους παρέχονταν διάλυμα ζάχαρης 10% w/v, ώστε να καλυφθούν οι διατροφικές τους ανάγκες. Την 7η ημέρα (ως 1η λαμβάνεται η ημέρα ενηλικίωσης της τελευταίας νύμφης) επιλέχτηκαν 25 ενήλικα από κάθε φύλο και μεταφέρθηκαν με αναρρόφηση σε ατομικούς κλωβούς ενηλίκων που κατασκευάστηκαν από ένα

διαφανές πλαστικό κύπελλο χωρητικότητας 400 mL που τοποθετήθηκε ανάποδα και στερεώθηκε στο καπάκι ενός τρυβλίου Petri διαμέτρου 9 cm. Ένα πλαϊνό παράθυρο (3 cm x 5 cm) χρησίμευε για αερισμό, ενώ μια μικρή οπή στο επάνω μέρος παρείχε τη δυνατότητα εισόδου στον κλωβό. Τροφή στα ενήλικα (διάλυμα ζάχαρης 5%) παρέχονταν από ένα βαμβακερό φυτίλι που περνούσε από τη βάση του κλωβού στην κάτω βάση του τρυβλίου Petri. Οι θάνατοι καταγραφόταν καθημερινά μέχρι το θάνατο του τελευταίου ατόμου. Η διαδικασία επαναλήφθηκε ώστε να συγκεντρωθεί ο αριθμός των 50 ατόμων από κάθε φύλο για κάθε μεταχείριση. Στη μεταχείριση με τα παρθένα άτομα, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία και για τα δύο φύλα αλλά στους διαφανείς κλωβούς τοποθετήθηκαν 80 νύμφες από το ίδιο φύλο ώστε ο συνωστισμός με τη μεταχείριση με τα συζευγμένα άτομα να είναι ο ίδιος.

4.3.3 Επίδραση ενός γεύματος αίματος στα δημογραφικά χαρακτηριστικά των θηλυκών

Μελετήθηκε η διάρκεια ζωής και η ωοπαράγωγή των συζευγμένων θηλυκών με ένα γεύμα αίματος. Μετά τη σύζευξη και την 7η ημέρα της ενήλικης ζωής παρέχονταν γεύμα αίματος όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 2. Τα ενήλικα (50 άτομα) που είχαν δεχτεί γεύμα αίματος μεταφέρονταν σε κλωβό Plexi glass 15 x 15 x 15 cm (βλέπε Κεφάλαιο 2) για δέκα ημέρες με σκοπό την ωοτοκία (πέντε ημέρες να πέψουν το αίμα και πέντε να ωοτοκήσουν). Η πέψη του αίματος γίνονταν αντιληπτή με μεταχρωματισμό της κοιλίας από χρώματος ερυθρό σε υπόλευκο. Στα ενήλικα παρέχονταν διάλυμα ζάχαρης 10% w/v, ώστε να καλυφθούν οι διατροφικές τους ανάγκες. Με την πέψη του αίματος, την 6η ημέρα τοποθετούνταν στον κλωβό μαύρο κυλινδρικό κύπελλο 20ml με νερό από εκτροφή προνυμφών που το εσωτερικό του ήταν καλυμμένο από αδρό διηθητικό χαρτί ως υπόστρωμα ωοτοκίας που προεξείχε από τη στάθμη του νερού με σκοπό να προσομοιάσει το περιβάλλον ωοτοκίας. Μετά την ωοτοκία τα ενήλικα θηλυκά μεταφέρθηκαν σε ατομικούς κλωβούς ενηλίκων (βλέπε παραπάνω 4.4.2) και καταγραφόταν καθημερινά οι θάνατοι μέχρι το θάνατο του τελευταίου ατόμου. Το διηθητικό χαρτί με τα ωά ξηραίνονταν για τρεις ημέρες στις συνθήκες που επικρατούσαν στον θάλαμο και τοποθετούνταν σε πλαστικό δοχείο 500 ml με νερό με σκοπό την εκκόλαψη και την ανάπτυξη των προνυμφών.

Τα ωά εκκολάπτονταν και η ανάπτυξη των προνυμφών γίνονταν σε
[125]

πλαστικό κυλινδρικό δοχείο 500 ml με παροχή τροφής ανά 2 ημέρες. Οι νύμφες τοποθετούνταν σε πλαστικό δοχείο 250 ml νερό με διαφανές καπάκι και καταμετρούνταν ο αριθμός των ενηλίκων καθώς και το φύλο τους.

4.3.4 Επίδραση δύο γευμάτων αίματος στα δημογραφικά χαρακτηριστικά

Για τα ενήλικα θηλυκά ακολουθήθηκε η διαδικασία της σύζευξης, της παροχής γεύματος αίματος, της πέψης αυτού και της ωοτοκίας όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Την επόμενη ημέρα της πρώτης ωοτοκίας παρέχονταν και το δεύτερο γεύμα αίματος με την ίδια διαδικασία. Μετά την ωοτοκία τα ενήλικα θηλυκά μεταφέρθηκαν σε ατομικούς κλωβούς ενηλίκων (βλέπε παραπάνω 4.4.2) και καταγραφόταν καθημερινά οι θάνατοι μέχρι το θάνατο του τελευταίου ατόμου. Τα ωά και οι προνύμφες που προέκυψαν και από τα δύο γεύματα αίματος μεταχειρίστηκαν με τον ίδιο, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω στο ένα γεύμα αίματος.

4.4 Στατιστική ανάλυση

Η επίδραση της σύζευξης, του φύλου και η αλληλεπίδραση αυτών στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων ελέγχθηκε με το πρότυπο ανάλογων κινδύνων Cox (Cox proportional hazard model). Η σύγκριση παρθένων και συζευγμένων αρσενικών και θηλυκών ως προς τον χρόνο ζωής τους πραγματοποιήθηκε κατά ζεύγη με τον έλεγχο Log-rank (Mantel-Cox). Ομοίως εξετάστηκε και η επίδραση των γευμάτων αίματος (κανένα, ένα και δύο γεύματα αίματος) στην διάρκεια ζωής των θηλυκών. Χρησιμοποιήθηκαν γενικευμένα γραμμικά μοντέλα (Generalised Linear Model - GLMs) ώστε να ελεγχθεί η επίδραση των γευμάτων αίματος (ένα και δύο γεύματα αίματος) στα δημογραφικά χαρακτηριστικά όπως η ωοπαραγωγή, αριθμός νυμφών, ποσοστό ωών που έγιναν νύμφες, αριθμός ενηλίκων, αριθμός αρσενικών και θηλυκών, αναλογία αρσενικών και θηλυκών, ενώ η ανάλυση των ίδιων δημογραφικών παραμέτρων στις δύο φάσεις του πειράματος στα δύο γεύματα αίματος (1^ο και 2^ο γεύμα αίματος) έγινε με τη δοκιμασία paired t-test για τιμές σε ζεύγη. Για όλες τις αναλύσεις το επίπεδο

σημαντικότητας ορίστηκε στο $\alpha = 0,05$. Η ανάλυση των δεδομένων καθώς και η σχεδίαση των γραφημάτων έγινε με το στατιστικό πακέτο IBM SPSS 25 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

4.5 Αποτελέσματα

Επίδραση της σύζευξης στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων

Η μέση διάρκεια ζωής των ενηλίκων του *Ae. albopictus* ανεξάρτητα από το φύλο και το ιστορικό σύζευξης κυμάνθηκε από περίπου 68 – 79 ημέρες (Πίνακας 4.1). Για κάθε μεταχείριση σύζευξης χρησιμοποιήθηκαν για τα αρσενικά 50 παρθένα και 49 συζευγμένα άτομα ενώ για τα θηλυκά 49 παρθένα και 50 συζευγμένα άτομα. Η μακροβιότητα στα παρθένα αρσενικά κυμάνθηκε από 30 - 115 ημέρες και στα συζευγμένα από 33 – 115 ημέρες, ενώ στα αντίστοιχα θηλυκά τις 37 - 118 και 29 - 111 ημέρες αντίστοιχα.

Το μοντέλο ανάλογων κινδύνων του Cox έδειξε ότι το φύλο, η σύζευξη και η αλληλεπίδραση του φύλου και της σύζευξης δεν είχαν σημαντική επίδραση στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων (Πίνακας 4.2).

Πίνακας 4.1 Επίδραση της σύζευξης στη διάρκεια ζωής αρσενικών και θηλυκών του *Aedes albopictus*.

Κατηγορία ενηλίκων	Μέσος όρος	Διάρκεια ζωής (ημέρες $\pm$ SE)		
		Τεταρτημόρια		
		25	50	75
Αρσενικά				
Παρθένα (n=50)	73,7 $\pm$ 3,4 α	88,0 $\pm$ 4,0	80,0 $\pm$ 8,0	56,0 $\pm$ 2,8
Συζευγμένα (n=49)	68,7 $\pm$ 3,1 α	82,0 $\pm$ 2,3	65,0 $\pm$ 2,8	54,0 $\pm$ 2,3
Θηλυκά				
Παρθένα (n=49)	79,3 $\pm$ 2,5 α	90,0 $\pm$ 2,4	82,0 $\pm$ 2,8	69,0 $\pm$ 3,9
Συζευγμένα (n=50)	77,5 $\pm$ 2,5 α	86,0 $\pm$ 3,0	80,0 $\pm$ 2,7	69,0 $\pm$ 2,4

Τιμές εντός της ίδιας στήλης και για το ίδιο φύλο, που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν σημαντικά (long rank test, $p > 0,05$)

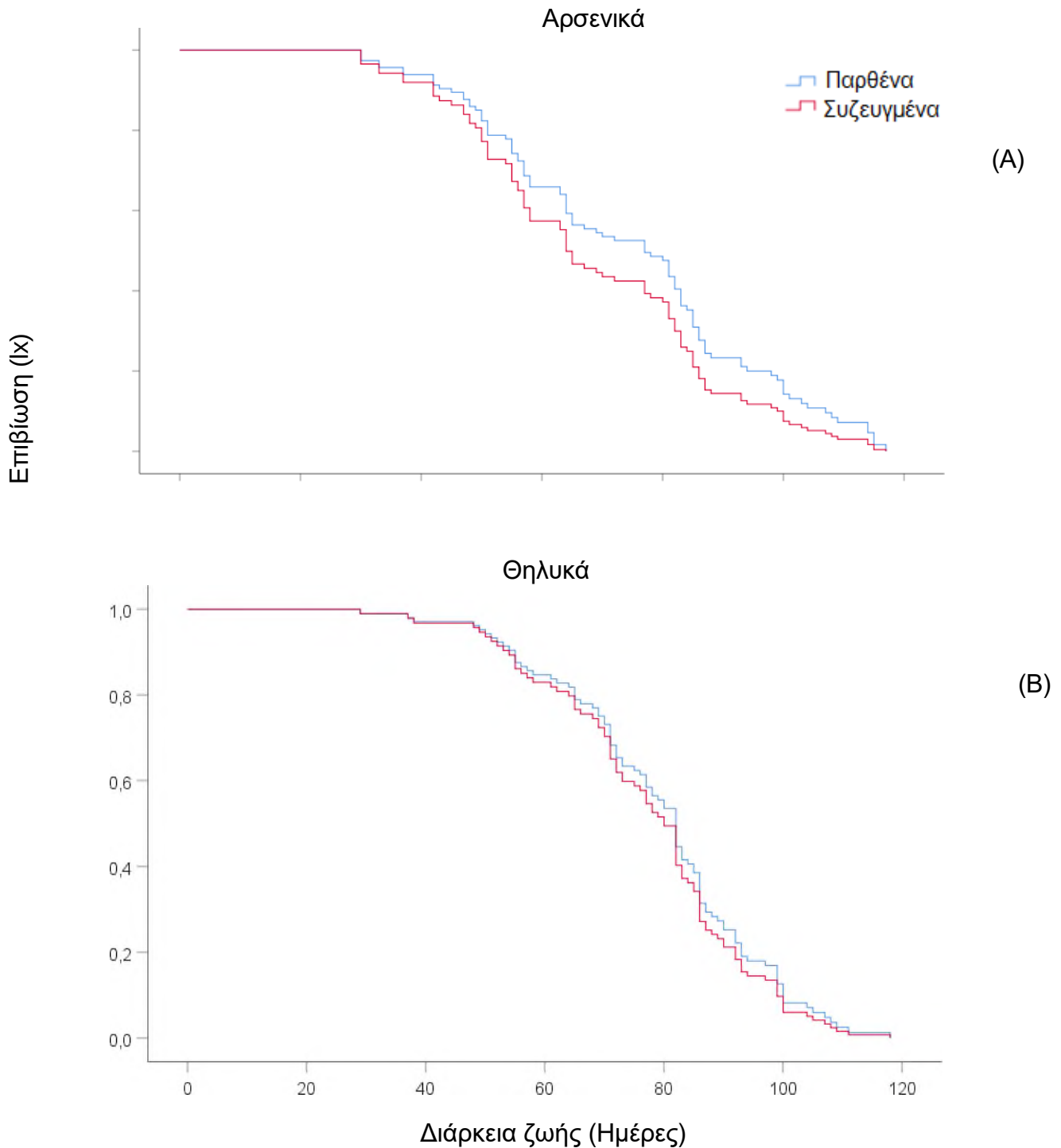
Πίνακας 4.2 Μεταβλητές του μοντέλου ανάλογων κινδύνων του Cox για την επίδραση της σύζευξης και του φύλου στη μακροβιότητα των ενηλίκων του *Aedes albopictus*.

Πηγή παραλλακτικότητας	$\beta \pm SE$	Exp(β)	p
Φύλο	0,251 $\pm$ 0,203	1,285	0,217
Σύζευξη	-0,132 $\pm$ 0,203	0,876	0,515
Φύλο x Σύζευξη	-0,188 $\pm$ 0,286	0,829	0,511

β εκτιμώμενοι συντελεστές στο μοντέλο παλινδρόμησης ανάλογων κινδύνων του Cox

Στο Διάγραμμα 4.1 απεικονίζεται η επιβίωση των συζευγμένων και παρθένων ενηλίκων αρσενικών και θηλυκών. Σε ό, τι αφορά τα αρσενικά, φαίνεται πως η σύζευξη είχε αρχικά αρνητική σχέση (μείωσε την διάρκεια ζωής τους) αλλά οι διαφορές μεταξύ συζευγμένων και παρθένων ενηλίκων δεν ήταν σημαντικές. Η πορεία της επιβίωσης σε σχέση με τη σύζευξη των ενηλίκων αρσενικών και θηλυκών ήταν παρόμοια και στα συζευγμένα και στα παρθένα άτομα. Η θνησιμότητα στα αρσενικά και στα θηλυκά έως την ηλικία των 55 ημερών ήταν χαμηλή <10%. Από την ηλικία των 60 περίπου ημερών και μετά παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της θνησιμότητας με αποτέλεσμα το 50%

των αρσενικών να έχει πεθάνει έως την ηλικία των 77 ημερών και των θηλυκών έως τις 82 ημέρες. Το δε 80% αρσενικών και θηλυκών είχαν πεθάνει έως και την ηλικία 90 και 97 ημερών αντίστοιχα.



Διάγραμμα 4.1 Αθροιστικές καμπύλες επιβίωσης (I_x) παρθένων και συζευγμένων αρσενικών (A) και θηλυκών (B) του *Aedes albopictus* σε σχέση με την ηλικία

Επίδραση του γεύματος αίματος στα δημογραφικά χαρακτηριστικά των θηλυκών

Η μέση διάρκεια ζωής των θηλυκών του *Ae. albopictus* με κανένα, ένα και δύο γεύματα αίματος κυμάνθηκε από 50 – 77 ημέρες με σημαντική επίδραση στη διάρκεια ζωής των θηλυκών (Πίνακας 4.3). Για τις μεταχειρίσεις χρησιμοποιήθηκαν 50, 42 και 49 θηλυκά άτομα αντίστοιχα. Η μακροβιότητα στα θηλυκά χωρίς γεύμα αίματος έφτασε τις 29 – 111, με γεύμα αίματος έφτασε τις 42 – 88 ημέρες ενώ με δύο γεύματα αίματος έφτασε τις 49 – 67 ημέρες.

Το μοντέλο ανάλογων κινδύνων του Cox έδειξε ότι το γεύμα αίματος καθώς και η συχνότητα αυτού είχαν σημαντική επίδραση στη διάρκεια ζωής των θηλυκών (Πίνακας 4.4). Η διάρκεια ζωής των συζευγμένων θηλυκών χωρίς γεύμα αίματος ήταν μακρύτερη σε σχέση με ένα και με δύο γεύματα αίματος ($p < 0,05$). Το ίδιο συνέβη και μεταξύ του ενός και δύο γευμάτων αίματος ως προς τη μακροβιότητά (log rank test, $p < 0,05$) (χωρίς γεύμα αίματος - ένα γεύμα αίματος, log rank, $\chi^2 = 13,115$, $p < 0,001$, χωρίς γεύμα αίματος – δύο γεύματα αίματος, $\chi^2 = 75,057$, $p < 0,001$, ένα γεύμα αίματος – δύο γεύματα αίματος, $\chi^2 = 60,201$, $p < 0,001$) (Πίνακας 4.3).

Πίνακας 4.3 Διάρκεια ζωής συζευγμένων θηλυκών του *Aedes albopictus* χωρίς, με ένα και με δύο γεύματα αίματος.

Θηλυκό	Διάρκεια ζωής (ημέρες $\pm$ SE)			
	Μέσος όρος	Τεταρτημόρια		
		25	50	75
Χωρίς γεύμα αίματος (n=50)	77,5 $\pm$ 2,5 ^α	86,0 $\pm$ 3,0	80,0 $\pm$ 2,7	69,0 $\pm$ 2,4
Ένα γεύμα αίματος (n=42)	70,5 $\pm$ 1,7 ^β	79,0 $\pm$ 1,0	72,0 $\pm$ 2,2	62,0 $\pm$ 4,6
Δύο γεύματα αίματος (n=49)	50,9 $\pm$ 1,2 ^γ	56,0 $\pm$ 0,9	52,0 $\pm$ 2,3	45,0 $\pm$ 1,9

Διαφορά στατιστικά σημαντική (pairwise comparisons, log rank, $p < 0.05$)

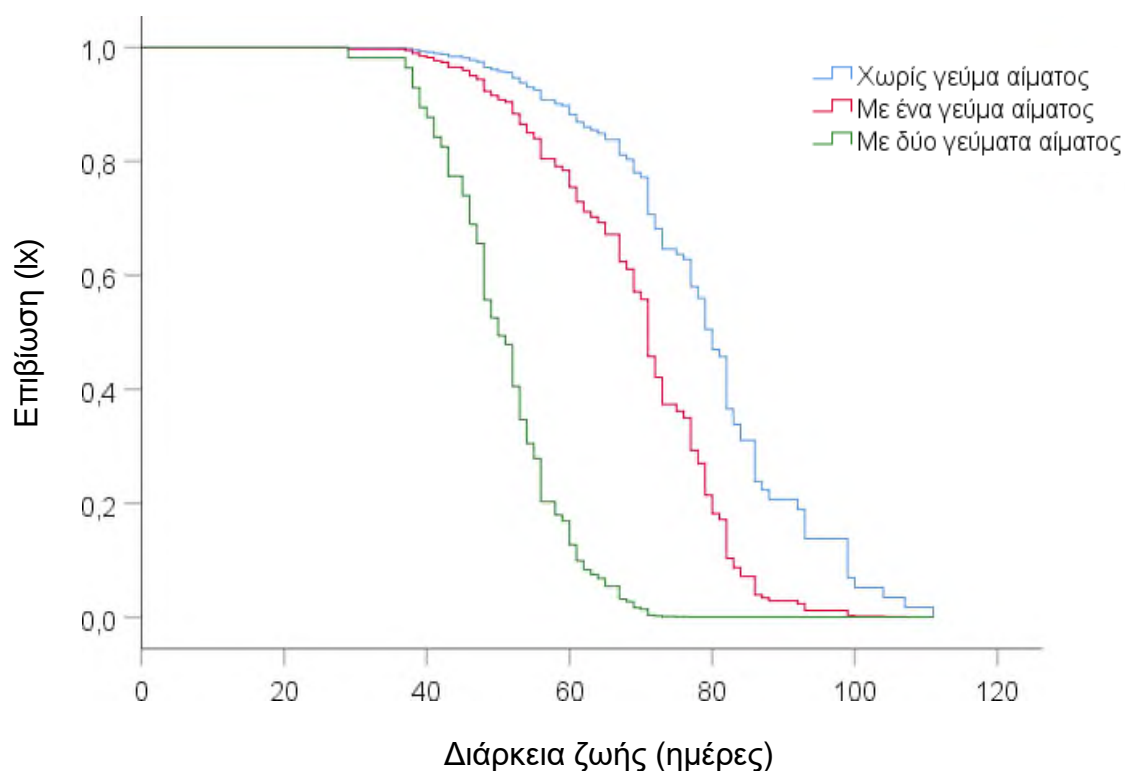
Πίνακας 4.4 Μεταβλητές του μοντέλου ανάλογων κινδύνων του Cox ενηλίκων χωρίς, με ένα και με πολλαπλά γεύματα αίματος του *Aedes albopictus*

Πηγή παραλλακτικότητας	$\beta \pm SE$	$\text{Exp}(\beta)$	p
Χωρίς γεύμα αίματος	$-2,807 \pm 0,311$	0,060	<0,001
Ένα γεύμα αίματος	$-1,993 \pm 0,283$	0,136	<0,001
Δύο γεύματα αίματος (ομάδα αναφοράς)			

β εκτιμώμενοι συντελεστές στο μοντέλο παλινδρόμησης ανάλογων κινδύνων του Cox

Στο Διάγραμμα 4.2 δίνεται η επιβίωση ενηλίκων συζευγμένων θηλυκών σε σχέση με τα γεύματα αίματος και τη συχνότητα αυτών. Φαίνεται πως το γεύμα αίματος μείωσε την διάρκεια ζωής τους σημαντικά μετά από ένα όσο και μετά από δύο γεύματα αίματος ($p < 0,05$).

Η θνησιμότητα των θηλυκών και στις τρεις μεταχειρίσεις ως την ηλικία των 37 ημερών ήταν <10%. Από την ηλικία των 40 περίπου ημερών και μετά παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της θνησιμότητας με αποτέλεσμα το 50% των θηλυκών χωρίς γεύμα αίματος, με ένα γεύμα αίματος και δύο γεύματα αίματος είχαν πεθάνει έως την ηλικία των 80, 70 και 50 ημερών αντίστοιχα. Το δε 80% των θηλυκών χωρίς γεύμα αίματος, με ένα γεύμα αίματος και δύο γεύματα αίματος είχαν πεθάνει έως και την ηλικία των 85, 75 και 55 ημερών αντίστοιχα.



Διάγραμμα 4.2 Αθροιστικές καμπύλες επιβίωσης συζευγμένων θηλυκών του *Ae. albopictus* χωρίς, με ένα και με δύο γεύματα αίματος

Στον Πίνακα 4.5 δίνονται τα στοιχεία που αφορούν την επίδραση του ενός και του 2^{ου} γεύματος αίματος στην ωοπαραγωγή και στα χαρακτηριστικά των απογόνων των θηλυκών του *Ae. albopictus*.

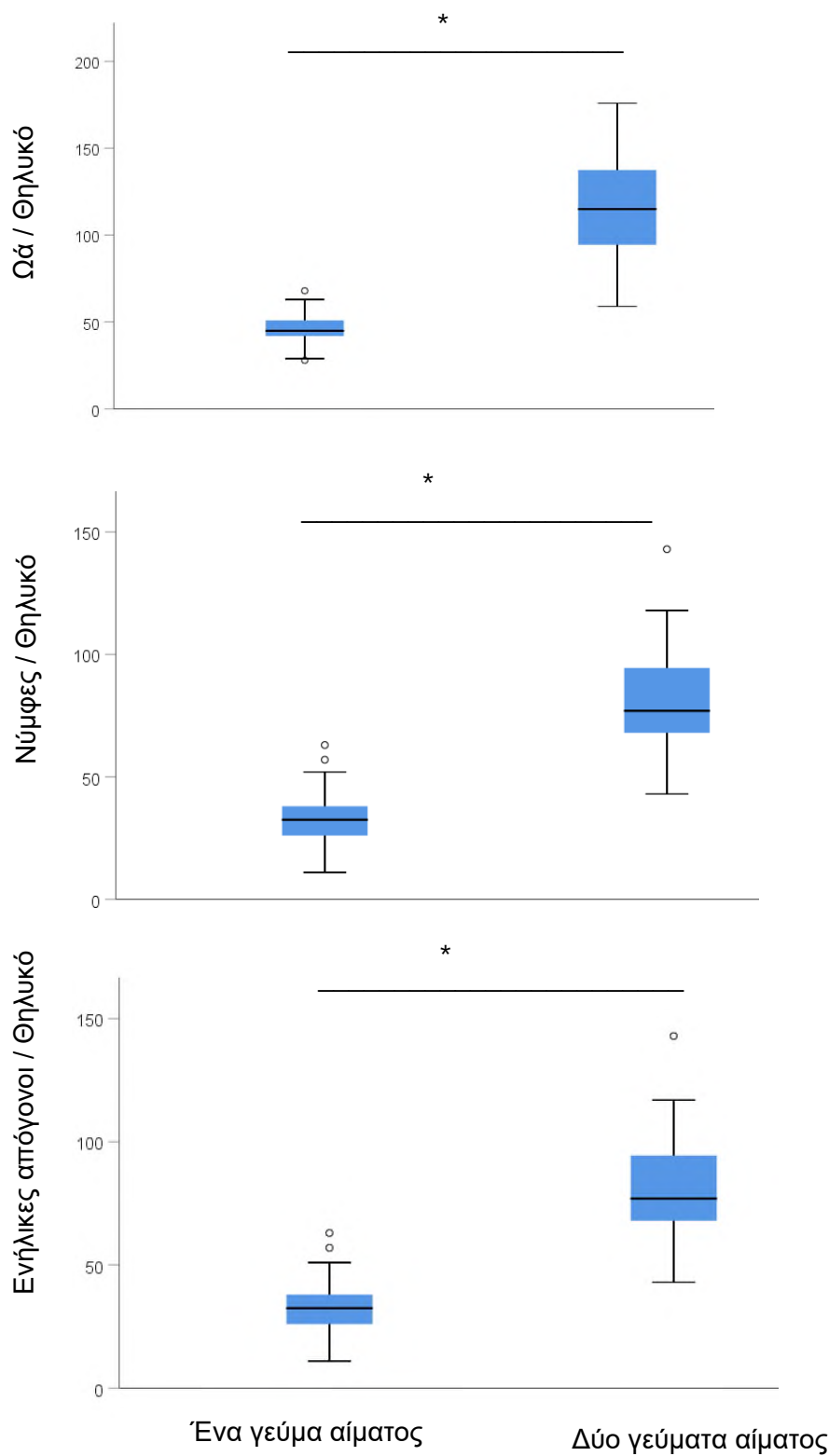
Τα δύο γεύματα είχαν σημαντική επίδραση στις δημογραφικές παραμέτρους του *Ae. albopictus* ($p < 0,05$) των οποίων οι τιμές ήταν υψηλότερες σε σχέση με την ομάδα αναφοράς (ένα γεύμα αίματος) όπως άλλωστε απεικονίζονται στα παρακάτω θηκογράμματα για όλες τις παραμέτρους εκτός από τον αριθμό των ενηλίκων απογόνων και για την αναλογία αρσενικών / θηλυκών απογόνων.

Πίνακας 4.5 Γενικευμένο γραμμικό μοντέλο για την επίδραση των γευμάτων αίματος στα δημογραφικά χαρακτηριστικά του *Aedes albopictus**

Μεταβλητή	β	Wald χ^2 **	p
Ωοπαραγωγή	70,138	239,596	<0,001
Αριθμός νυμφών	48,189	180,056	<0,001
Ποσοστό νύμφωσης	-0,017	0,263	0,608
Αριθμός ενηλίκων απογόνων	48,290	181,952	<0,001
Αριθμός αρσενικών απογόνων	25,063	98,088	<0,001
Αριθμός θηλυκών απογόνων	23,243	109,187	<0,001
Αναλογία αρσενικών/θηλυκών απογόνων	-0,050	0,149	0,699

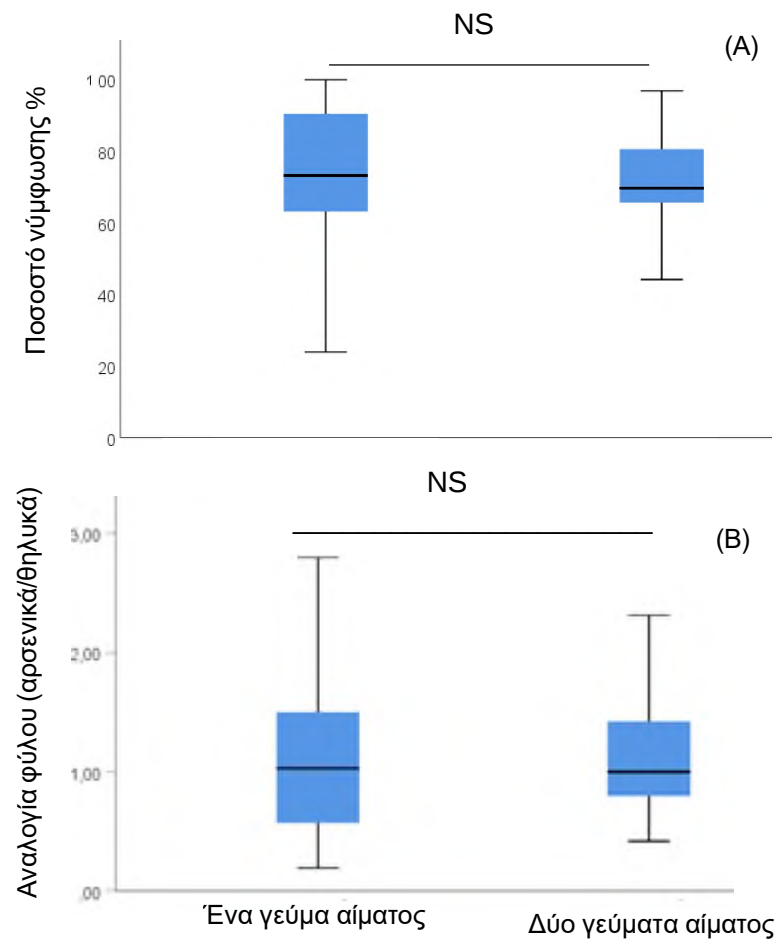
*Ομάδα αναφοράς: ένα γεύμα αίματος,
**df=1

Στο Διάγραμμα 4.3 δίνεται η ωοπαραγωγή και ο αριθμός των νυμφών και των ενηλίκων απογόνων μετά από ένα και δύο γεύματα αίματος. Η λήψη δεύτερου γεύματος αίματος διπλασίασε την ωοπαραγωγή των θηλυκών (Διάγραμμα 4.3). Αντίστοιχη ήταν και η επίδραση του δεύτερου γεύματος αίματος και στις παραγόμενες νύμφες και στους ενήλικους απογόνους.



Διάγραμμα 4.3 Επίδραση του αριθμού γευμάτων αίματος (ένα ή δύο) στην ωοπαραγωγή (Α), στον αριθμό των παραγόμενων νυμφών (Β) και στον αριθμό των ενηλίκων απογόνων (αρσενικών και θηλυκών) (Γ). Ο αστερίσκος (*) δείχνει σημαντική διαφορά ($p < 0,05$, Διάγραμμα 4.3) (Βλ. Παράρτημα IV)

Στο Διάγραμμα 4.4, δίνεται το ποσοστό νύμφωσης που κυμάνθηκε από 60 έως 70 % περίπου καθώς και η αναλογία φύλου που κυμάνθηκε στο 1:1 περίπου και δεν διέφεραν σε σχέση με τον αριθμό (ένα ή δύο) των γευμάτων αίματος.



Διάγραμμα 4. Επίδραση του αριθμού των γευμάτων νύμφωσης (A) και στην αναλογία φύλου (B) των παραγόμενων ενηλίκων απογόνων του *Aedes albopictus*

Επίδραση των πολλαπλών γευμάτων αίματος στα δημογραφικά χαρακτηριστικά

Στον Πίνακα 4.6 παρουσιάζεται η ανάλυση των αποτελεσμάτων για τα θηλυκά που δέχτηκαν δύο γεύματα αίματος και αναλύθηκαν εκ νέου ώστε να αξιολογήσουμε την παραγωγή απογόνων μετά από κάθε γεύμα αίματος. Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική επίδραση του δεύτερου γεύματος αίματος στις υπό εξέταση μεταβλητές ($p > 0,1$). Η πιο αξιοσημείωτη αλλά μη στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε στην παραγωγή αρσενικών απογόνων ($21,59 \pm 1,26$ έναντι $19,87 \pm 1,12$).

Πίνακας 4.6 Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές των δημογραφικών παραμέτρων για θηλυκά του *Ae. albopictus* που δέχτηκαν ένα και με δύο γεύματα αίματος. Ο αριθμός των θηλυκών που χρησιμοποιήθηκαν είναι 47.

Παράμετρος	MT $\pm$ SE 1 ^ο γεύμα αίματος	MT $\pm$ SE 2 ^ο γεύμα αίματος	<i>t</i> -paired κριτήριο	<i>p</i>
Ωοπαραγωγή	57,95 $\pm$ 2,54	58,08 $\pm$ 2,33	- 0,051	0,960
Αριθμός νυμφών	41,12 $\pm$ 2,08	40,68 $\pm$ 1,39	0,244	0,808
Ποσοστό νύμφωσης	72,48 $\pm$ 2,40	72,85 $\pm$ 2,38	-0,103	0,918
Αριθμός ενηλίκων απογόνων	41,08 $\pm$ 2,07	40,68 $\pm$ 1,39	0,221	0,826
Αριθμός αρσενικών απογόνων	21,59 $\pm$ 1,26	19,87 $\pm$ 1,12	1,637	0,108
Αριθμός θηλυκών απογόνων	19,51 $\pm$ 1,34	20,80 $\pm$ 1,13	-0,785	0,437
Αναλογία αρσενικών/θηλυκών απογόνων	1,31 $\pm$ 0,11	1,13 $\pm$ 0,11	1,141	0,260

4.6 Συζήτηση

Τα αποτελέσματα του παρόντος κεφαλαίου έδειξαν ότι: α) η σύζευξη δεν επηρέασε την διάρκεια ζωής ούτε των αρσενικών ούτε των θηλυκών του *Ae. albopictus*. Αντίθετα β) ο αριθμός των γευμάτων αίματος μείωσε τη διάρκεια ζωής των θηλυκών. Συγκεκριμένα τα συζευγμένα θηλυκά χωρίς γεύμα αίματος είχαν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής από εκείνα που έλαβαν ένα γεύμα αίματος τα οποία με τη σειρά τους είχαν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής από εκείνα που έλαβαν δύο γεύματα αίματος. Ιδιαίτερα, τα δύο γεύματα αίματος μείωσαν κατά περίπου ένα μήνα τη διάρκεια ζωής των θηλυκών σε σχέση με τα συζευγμένα θηλυκά και σε σχέση με εκείνα που έλαβαν ένα γεύμα αίματος. γ) Το δεύτερο γεύμα αίματος αύξησε την παραγωγή των ωών και των απογόνων των θηλυκών. Συγκεκριμένα, το δεύτερο γεύμα αίματος διπλασίασε σχεδόν όλες τις παραμέτρους που σχετίζονται με την παραγωγή ωών όπως είναι ο αριθμός των νυμφών ανά θηλυκό, το ποσοστό νύμφωσης των ωών και ο αριθμός των ενηλίκων απογόνων εκτός από την αναλογία φύλου που παρέμεινε σταθερή (1:1). Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα θα μπορούσαν να έχουν εφαρμογή στην ανάπτυξη στοχευμένων και εξειδικευμένων προγραμμάτων κωνωποκτονίας καθώς και στη δημιουργία επιδημιολογικών μοντέλων επιτήρησης μολυσματικών ασθενειών.

Η σύζευξη μπορεί να έχει επιπτώσεις στη φυσιολογία των αρσενικών και των θηλυκών κουνουπιών. Ειδικότερα, τα αρσενικά του *Ae. albopictus* είναι πολυγαμικά (Mastronikolos et al., 2022) αλλά για να συμβεί αυτό χρειάζεται επαρκές χρονικό διάστημα συνύπαρξης με τα θηλυκά στον ίδιο χώρο. Στη συγκεκριμένη μελέτη το κόστος της σύζευξης των αρσενικών είναι μικρό καθώς δεν επηρεάστηκε η μακροβιότητά τους καθώς ο λιγοστός χρόνος συνύπαρξης με τα θηλυκά πιθανώς οδήγησε σε περιορισμένο αριθμό συζεύξεων. Σε άλλα έντομα όπως στη μύγα της Μεσογείου η σύζευξη μειώνει δραστικά τη διάρκεια ζωής των αρσενικών (Papadopoulos et al., 2010).

Αντίστοιχα, το σπέρμα των αρσενικών μαζί με τα συνοδά εκκρίματα επηρεάζει (είτε θετικά είτε αρνητικά) την επιβίωση των θηλυκών σε αρκετά είδη εντόμων (Arnqvist and Nilsson, 2000; Chapman et al., 1995). Εκτός από το σπέρμα, τα αρσενικά σε πολλά είδη αρθρόποδων μεταφέρουν μεγάλο αριθμό

πρωτεϊνών σπερματικού υγρού (Seminal fluid proteins - Sfps) στα θηλυκά που κυρίως παράγονται στους αρσενικούς γενετικούς αδένες (Male accessory glands - MAG) και επάγουν ένα ευρύ φάσμα συμπεριφορών μετά τη σύζευξη (Avila et al., 2011; Baldini et al., 2012; Gillott, 2003; Knowden, 1999). Τα Sfps μπορεί να επηρεάσουν τη διάρκεια ζωής των θηλυκών και, σε ορισμένα είδη μύγας, η μακροβιότητα επηρεάζεται αρνητικά. Ειδικότερα, στη μύγα της Μεσογείου, η σύζευξη επηρεάζει αρνητικά την διάρκεια ζωής των θηλυκών (Chapman et al., 1998), γεγονός που συμβαίνει και για τα θηλυκά της *Drosophila* που συζευγνύονται σε υψηλές συχνότητες (Fowler & Partridge, 1989).

Σε έρευνα της Oliva και συν. (2013) σχετικά με το *Ae. albopictus* η μεταφορά και αποθήκευση σπέρματος παίζει καθοριστικό ρόλο στη γονιμότητα των ωών. Σε περίπτωση διπλής σύζευξης, τα ωά των θηλυκών είχαν περισσότερες πιθανότητες να γονιμοποιηθούν και από τα δύο αρσενικά μόνο εάν και οι δύο συζεύξεις γίνονταν μέσα σε διάστημα 40 λεπτών. Μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα μεταξύ των συζεύξεων οδήγησαν σε απογόνους μόνο από το πρώτο αρσενικό, σε αρκετούς γονοτροφικούς κύκλους. Όταν πολλά θηλυκά προσφέρθηκαν σε αρσενικά σε μια ταχεία αλληλουχία συζεύξεων, τα περισσότερα αρσενικά προσπάθησαν να συζευχθούν ανεξάρτητα από τη διαθέσιμη παροχή σπέρματος ή το βοηθητικό υλικό έκκρισης αδένων. Η ποσότητα των σπερματοζωαρίων που μεταφέρθηκε από τα αρσενικά σε μια αλληλουχία συζεύξεων μειώθηκε, όπως φαίνεται από τον αριθμό των σπερματοζωαρίων στις σπερματοθήκες.

Επίσης, μελέτες έδειξαν ότι το συζευγμένο θηλυκό *Ae. aegypti* ζει περισσότερο σε σχέση με το παρθένο (Liles, 1965; Liles and Delong, 1960) σε αντίθεση με την παρούσα έρευνα όπου δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά στη μακροβιότητα του θηλυκού *Ae. albopictus*. Οι διαφορές που προκύπτουν με την παρούσα έρευνα πιθανώς οφείλονται τόσο στις πειραματικές συνθήκες αλλά κυρίως στη γενετική διαφοροποίηση μεταξύ του *Ae. aegypti* και του *Ae. albopictus*. Σε έρευνα των Villarreal και συν. (2018) η σύζευξη αύξησε την επιβίωση στο *Ae. aegypti* με σχέση με τα παρθένα θηλυκά. Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι τόσο το ένα όσο και τα πολλαπλά (δύο) γεύματα αίματος επηρεάζουν τη διάρκεια ζωής των θηλυκών του *Ae. albopictus* καθώς η

διάρκεια ζωής των συζευγμένων κουνουπιών του *Ae. albopictus* χωρίς γεύμα αίματος ήταν σημαντικά μακρύτερη από εκείνη με ένα και με δύο γεύματα αίματος. Οι μελέτες που υπάρχουν σχετικά με το *Ae. albopictus* και τα πολλαπλά γεύματα διατροφής επικεντρώνονται στον αριθμό των γονοτροφικών κύκλων (Dieng & et al., 2010) και στην ωοπαραγωγή και όχι στην επιβίωση, που αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην ανάπτυξη επιδημιολογικών μοντέλων πρόβλεψης ασθενειών κουνουπιών καθώς και προγραμμάτων καταπολέμησης, στοιχείο καινοτομίας της παρούσας έρευνας.

Ειδικότερα, για να μεταδοθεί μία μολυσματική ασθένεια μεταξύ δύο ζωικών οργανισμών χρειάζονται τουλάχιστον δύο γεύματα αίματος (κατά το πρώτο γεύμα αίματος το κουνούπι λαμβάνει το μολυσματικό παράγοντα από τον έναν ξενιστή και το μεταδίδει στον άλλον)· η δε διάρκεια ζωής του κουνουπιού καθορίζει και το χρονικό διάστημα που πρέπει να ληφθούν μέτρα δημόσιας υγείας καθώς υπάρχει ενδεχόμενο για πολλαπλές μολύνσεις. Συνεπώς, η προτίμηση του ξενιστή και η επίδραση του γεύματος αίματος στη διάρκεια ζωής και στα ωοπαραγωγικά χαρακτηριστικά των θηλυκών αποτελεί ύψιστη σημασία για την αποτελεσματική καταπολέμηση των κουνουπιών. Γι' αυτό το σκοπό έχει μελετηθεί εκτενώς ο ρόλος του ανθρωπίνου αίματος και οι εκκρίσεις του σώματος που σχετίζονται με το δέρμα και την αναπνοή ως κρίσιμοι παράγοντες που ευθύνονται για την διατροφική προτίμηση των κουνουπιών στον άνθρωπο (Braks, Anderson and Knols, 1999; Costantini et al., 2001; Dekker and Takken, 1998; Dekker, Takken and Braks, 2001; Dekker et al., 2002; Duchemin et al., 2001; Gibson and Torr, 1999; Mboera et al., 1997; Mboera, Takken and Sambu, 2000; Pates et al., 2001b; Sousa et al., 2001).

Αξίζει να σημειωθεί πως στη φύση η διατροφή του *Ae. aegypti*, συγγενικό είδος του *Ae. albopictus*, με φρουκτόζη είναι σπάνια (Edman et al., 1992; Van Handel et al., 1994). Μελέτες μακροβιότητας δείχνουν ότι η διατροφή με ανθρώπινο αίμα και όχι με ζάχαρη προσφέρει πλεονέκτημα αρμοστικότητας (Costero et al., 1998b; Scott et al., 1997). Σε πειράματα μακροβιότητας του *Ae. aegypti* βρέθηκε ότι τα κουνούπια που έλαβαν γεύμα αίματος από άνθρωπο επιβίωσαν σημαντικά περισσότερο σε σχέση με εκείνα που έλαβαν γεύμα αίματος από τρωκτικά (Harrington, Edman και Scott, 2001).

Σε πρόσφατες έρευνες σχετικά με τη μακροβιότητα του *Ae. albopictus* οι

Figrig & συν. (2021) ανακάλυψαν πως φυλές κουνουπιών από την Βαλτιμόρη και από το Long Island των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής είχαν σημαντικά μεγαλύτερη μακροβιότητα με γεύμα αίματος από άνθρωπο σε σύγκριση με τρωκτικό. Επίσης, οι Cui & συν. (2021) διαπίστωσαν πως η επιβίωση των θηλυκών κουνουπιών του *Ae. albopictus* με γεύματα αίματος από τρωκτικό ήταν μεγαλύτερη από το διπλάσιο σε σχέση με τους Muhammad & συν. (2020). Η επιβίωση και στις δύο περιπτώσεις ήταν σαφώς μεγαλύτερη από τους Figrig & συν. (2021) είτε επρόκειτο για γεύμα αίματος από άνθρωπο είτε από τρωκτικό. Σε έρευνα των Souvik De & συν. (2022) η μακροβιότητα των θηλυκών από την Jodhpur της Ινδίας ήταν μικρότερη από την Καλκούτα, αλλά σαφώς μεγαλύτερη σε σχέση με όλες τις προαναφερθείσες έρευνες.

Σημειώνεται ότι οι Cui & συν. (2021), οι Muhammad & συν. (2020) καθώς και οι Souvik De & συν. (2022) για να μελετήσουν τη μακροβιότητα των ενηλίκων κουνουπιών χρησιμοποίησαν στην έρευνά τους τρωκτικά, που από τη φύση τους, τα συστατικά του αίματός τους (πρωτεΐνες) πλησιάζουν αλλά δεν ταυτίζονται με τα ανθρώπινα. Αντιθέτως, στις έρευνες των Figrig & συν. (2021) (Harrington, Edman και Scott, 2001) χρησιμοποιήθηκε γεύμα αίματος τόσο από άνθρωπο όσο και από τρωκτικό, ενώ η παρούσα έρευνα διεξήχθη αποκλειστικά με ανθρώπινο αίμα. Οι διαφορές στον τύπο του αίματος πιθανώς να ερμηνεύουν και τις διαφορές και τις ομοιότητες στα αποτελέσματα, καθώς και τους στόχους της κάθε έρευνας.

Σε όλες τις μελέτες η διάρκεια ζωής κουνουπιών με ένα γεύμα αίματος ήταν σημαντικά μικρότερη σε σχέση με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται τόσο στις διαφορετικές πειραματικές συνθήκες όσο και σε φυσικούς παράγοντες. Πιθανώς να ευθύνεται και ο τύπος του γεύματος αίματος (τρωκτικό – ανθρώπινο) καθώς έρευνες αναφέρουν τη σημαντική διαφορά στη διάρκεια ζωής (Edman, 2004).

Συμπερασματικά φαίνεται πως το γεύμα αίματος επηρεάζει την ωοπαραγωγή στο *Ae. albopictus* καθώς η ωοπαραγωγή σχεδόν διπλασιάστηκε με τα δύο γεύματα αίματος σε σχέση με το ένα γεύμα αίματος. Τα ευρήματα σχετικά με το ένα γεύμα αίματος συμφωνούν με εκείνα των Muhammad και συν. (2020). Παράλληλα διαπιστώθηκε πως και στο δεύτερο γεύμα αίματος η ωοπαραγωγή παρέμεινε σταθερή (που σημαίνει πως

αθροιστικά η ωοπαραγωγή διπλασιάστηκε) εύρημα που συμφωνεί με παρόμοια έρευνα των Dieng και συν. (2010) ακόμη και σε πολλούς γονοτροφικούς κύκλους.

Ενώ ενδεχομένως θα αναμενόταν ελάττωση στη δεύτερη ωοπαραγωγή σε απόλυτους αριθμούς εξαιτίας της γήρανσης των κουνουπιών όπως αναμένεται στους φυσικούς οργανισμούς. Έρευνες από τους Dimond και συν. (1956) και οι Bellamy και Bracken (1971) διαπίστωσαν ότι τα αμινοξέα που βρίσκονται στο αίμα των διαβιβαστών αυξάνουν την ωοπαραγωγή τους. Αυτό έχει ως συνέπεια η ωοπαραγωγή να παραμένει σταθερή και στο δεύτερο γεύμα αίματος. Πιο συγκεκριμένα, οκτώ αμινοξέα (αργινίνη, ισολευκίνη, λευκίνη, λυσίνη, φαινυλαλανίνη, θρεονίνη, τρυπτοφάνη και βαλίνη) είναι απαραίτητα για την ωοπαραγωγή και η έλλειψη κάποιου από αυτά την καθιστά ανέφικτη (Dimond et al., 1956). Συνεπώς, στην παρούσα έρευνα ο διαβιβαστής έλαβε όλα τα αμινοξέα που είναι απαραίτητα για την ωοπαραγωγή.

Μία ακόμη έρευνα στο *Ae. aegypti* με παροχή ανθρώπινου αίματος με τεχνητό τρόπο ή ανθρώπινο αίμα συμπληρωμένο με ισολευκίνη (=υψηλό ILE αίμα) έδειξε ότι το αίμα με χαμηλή ισολευκίνη δεν μειώνει τη γονιμότητα όταν αυτό προσφέρεται καθημερινά στα θηλυκά χωρίς ζάχαρη. Παραδόξως δε, τα κουνούπια που τρέφονταν με ανθρώπινο αίμα (χαμηλή περιεκτικότητα σε ισολευκίνη) συσσωρεύσαν σημαντικά περισσότερα θρεπτικά αποθέματα, ειδικά λιπίδια, από εκείνα που τρέφονταν με το ίδιο αίμα με συμπλήρωμα ισολευκίνης. Ομοίως και στη συγκεκριμένη περίπτωση η γονιμότητα δε μειώθηκε αλλά τα αποθέματα λιπιδίων και γλυκογόνου αυξήθηκαν όταν τα θηλυκά έλαβαν επανειλημμένα ανθρώπινο αίμα χαμηλής ισολευκίνης (Harrington, Edman & Scott, 2001).

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί πως η διατροφή με πολλαπλά γεύματα αίματος και με μειωμένη ποσότητα σακχάρου ευθύνονται για την ελλειπωμένη ωοτοκία λόγω χαμηλής ισολευκίνης (Dimond et al., 1956) επαναλήφθηκε το προηγούμενο πείραμα με κουνούπια ομοιόμορφου μεγέθους που τρέφονταν με υδατικό διάλυμα ζάχαρης (Edman & Takken, 2003). Τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος (αν και το πρωτόκολλο ήταν σε αντίθεση με ό,τι έχει παρατηρηθεί στη φύση), έδειξαν ότι η διατροφή με ανθρώπινο αίμα είχε ως αποτέλεσμα μικρότερη γονιμότητα (Harrington, Edman & Scott, 2001). Αυτό

υποδηλώνει διαφοροποίηση στο μεταβολισμό του ανθρωπίνου αίματος σε σύγκριση με άλλους τύπους αίματος (Naksathit, Edman & Scott 1999b; 1999a).

Άλλα ενδιαφέροντα συμπεράσματα της παρούσας έρευνας είναι πως η εκκολαψιμότητα των ωών και το ποσοστό νύμφωσης ήταν υψηλότερα σε σχέση με την έρευνα των Cui και συν. (2021). Επίσης, ο αριθμός των ενήλικων ατόμων ήταν υψηλότερος σε σχέση με εκείνον της έρευνας του Cui et al. (2021). Τα υψηλότερα ποσοστά εκκολαψιμότητας, νύμφωσης και ενηλίκων που παρατηρήθηκαν στην παρούσα έρευνα σε σχέση με στις προαναφερθείσες έρευνες συνηγορούν για τον αυξημένο κίνδυνο μετάδοσης μολυσματικών ασθενειών και δείχνουν τις δυνητικές εφαρμογές των αποτελεσμάτων της παρούσας έρευνας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΣΤΕΙΡΩΜΕΝΩΝ ΑΡΣΕΝΙΚΩΝ ΤΟΥ *Aedes albopictus*

5.1 Περίληψη

Οι μέθοδοι καταπολέμησης κουνουπιών με βάση τη γενετική κερδίζουν έδαφος τα τελευταία χρόνια αφού έχουν επιτύχει την αποτελεσματική μείωση ή και αντικατάσταση πληθυσμών εντόμων που μεταφέρουν ασθένειες, χωρίς να βλάπτουν το περιβάλλον ή να προκαλούν κίνδυνο για τη δημόσια υγεία. Αυτές οι μέθοδοι απαιτούν τη μαζική εκτροφή των ειδών-στόχων σε εγκαταστάσεις μεγάλου μεγέθους ώστε να παράγουν εκατομμύρια στερωμένα αρσενικά, όπως συμβαίνει και με τα έντομα γεωργικής σημασίας. Η αξιολόγηση της σύζευξης των αρσενικών σε προγράμματα καταπολέμησης που έχει χρησιμοποιηθεί η τεχνική της εξαπόλυσης στερωμένων εντόμων (Sterile Insect Technique - SIT) είναι υψίστης σημασίας για την επιτυχία του προγράμματος. Ο χειρισμός στερωμένων εντόμων και η αποστολή τους σε απομακρυσμένες περιοχές μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την ποιότητα τους καθώς και τους παράγοντες που σχετίζονται με τη βιολογία τους, με συνέπεια να μην επιτυγχάνεται το επιθυμητό αποτέλεσμα. Ο στόχος του παρόντος κεφαλαίου ήταν ο σχεδιασμός και η εκτέλεση δοκιμών ποιοτικού ελέγχου (QC) για στερωμένα αρσενικά του *Aedes albopictus* (ασιατικό κουνούπι τίγρης) που μεταφέρθηκαν αεροπορικώς από τη μονάδα μαζικής παραγωγής που βρίσκεται στην Ιταλία στον τόπο εξαπόλυσης, στην Ελλάδα και στο Μαυροβούνιο. Οι δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν στις εγκαταστάσεις μαζικής εκτροφής πριν από τη μεταφορά αποκάλυψαν ένα μάλλον υψηλό ποσοστό υπολειπόμενης μόλυνσης του πληθυσμού με θηλυκά μετά τον διαχωρισμό αρσενικών και θηλυκών (περίπου 1,5% θηλυκά, ανεξάρτητα από τον πληθυσμό των κουνουπιών). Τα στερωμένα αρσενικά και των τριών πληθυσμών κουνουπιών που χρησιμοποιήθηκαν προκάλεσαν υψηλά επίπεδα στείροτητας στα θηλυκά.

Η αποστολή με διάρκεια κοντά στις 24 ώρες είχε ως αποτέλεσμα περίπου 15% θνησιμότητα, ενώ όταν η διάρκεια της αποστολής ήταν σχεδόν δύο ημέρες η θνησιμότητα αυξήθηκε σχεδόν στο 40%. Η ικανότητα πτήσης των στερωμένων αρσενικών με διάρκεια μεταφοράς μίας ημέρας ήταν ικανοποιητική (πάνω από 60%), η απόκριση στην έλλειψη τροφής και νερού ήταν συγκρίσιμη και ελαφρώς χαμηλότερη σε σχέση με τα άγρια αρσενικά, ενώ η μακροβιότητα ήταν μικρότερη και δεν επηρεάστηκε από τη σύζευξη με θηλυκά. Η συχνότητα και η ανταγωνιστικότητα σύζευξης με άγρια παρθένα θηλυκά ήταν υψηλότερη για τα άγρια αρσενικά σε σύγκριση με τα στερωμένα. Συνολικά, η απόδοση του στερωμένου αρσενικού *Ae. albopictus* που παραδόθηκε από τις εγκαταστάσεις μαζικής εκτροφής της Ιταλίας στην Ελλάδα σε περίπου 24 ώρες ήταν ικανοποιητική. Η μεταφορά που διήρκησε δύο ή περισσότερες ημέρες είχε αρνητικές επιπτώσεις στα αρσενικά, γεγονός που έθετε υπό αμφισβήτηση την έκβαση των προγραμμάτων εξαπόλυσης με την τεχνική των στερωμένων εντόμων (SIT). Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά καταδεικνύουν την ανάγκη διαδικασιών ποιοτικού ελέγχου, ειδικά όταν οι εγκαταστάσεις παραγωγής στερωμένων αρσενικών δεν βρίσκονται κοντά στο σημείο απελευθέρωσης. Η μεταφορά θα μπορούσε να είναι ένα σοβαρό μειονέκτημα για την απελευθέρωση στερωμένων εντόμων και είναι σημαντικό να καθιερωθεί εκ των προτέρων μια αποτελεσματική και γρήγορη μεταφορά τους.

5.2 Εισαγωγή

Η τεχνική εξαπόλυσης στερωμένων εντόμων (Sterile Insect Technique - SIT) περιλαμβάνει τη μαζική εκτροφή και εξαπόλυση μεγάλου αριθμού στερωμένων αρσενικών στη φύση και είναι μια φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος για τη διαχείριση του πληθυσμού των εντόμων (καταστολή, εκρίζωση και πρόληψη εγκατάστασης) (Dyck et al., 2005; Knipling, 1955; Knipling, 1979; Knipling, 1998; Krafur, 1998) (βλέπε Κεφάλαιο 1). Τα στερωμένα αρσενικά συζευγνύονται με άγρια θηλυκά που ωοτοκούν άγονα ωά, μειώνοντας σταδιακά τους ρυθμούς αναπαραγωγής των άγριων πληθυσμών. Ως εκ τούτου, με την υπόθεση ότι ανταγωνιστικά στερωμένα αρσενικά εξαπολύονται για αρκετές εβδομάδες, ο τοπικός άγριος πληθυσμός μπορεί να μειωθεί ή και να εκριζωθεί

(Alphey et al., 2010; Klassen et al., 2020; Oliva et al., 2021).

Προφανώς, η επιτυχία ενός προγράμματος SIT εξαρτάται από την αναλογία των στείρων αρσενικών με τα άγρια καθώς και από την ποιότητά τους. Εάν αυτή είναι χαμηλή, τότε η αποτελεσματικότητα του προγράμματος μειώνεται (Cayol et al., 2002; Robinson et al., 2002). Στα περισσότερα προγράμματα SIT εξαπολύονται σε μεγάλες ποσότητες στείρων αρσενικών που υπερτερούν αριθμητικά από τα άγρια («αναλογίες υπερπληθυσμού»). Το συνολικό κόστος παραγωγής των στείρων εντόμων είναι απαγορευτικό για πολλές επεμβάσεις, γεγονός που οδηγεί στην ανάγκη να επιτευχθεί μια ισορροπία που να διασφαλίζει ότι παράγονται και εξαπολύονται αρκετά στείρα αρσενικά με το χαμηλότερο δυνατό κόστος (Madakacherry et al., 2014; Oliva et al., 2021).

Επιπλέον, οι αρνητικές επιπτώσεις της στέρωσης στην ικανότητα σύζευξης και στη μακροβιότητα μπορούν να ελαχιστοποιηθούν με την προσαρμογή του χρόνου ακτινοβολίας και της δόσης (Andreasen et al., 2005; Parker et al., 2020; Robinson et al., 2002). Προηγούμενες μελέτες σε μύγες φρούτων (Diptera: Tephritidae) έδειξαν ότι τόσο η ακτινοβολήση σε υψηλές δόσεις για την επίτευξη υψηλών ποσοστών στειρότητας (Rull et al., 2012; Rull et al., 2014; Toledo et al., 2004) όσο και η μαζική εκτροφή μειώνουν την ανταγωνιστικότητα σύζευξης των στείρων αρσενικών σε σχέση με τα άγρια (Lux et al., 2002; Rull et al., 2012). Εκτός από τις αρνητικές επιπτώσεις της μαζικής παραγωγής και της στέρωσης στην ποιότητα των στείρων αρσενικών, η μεταφορά στην περιοχή εξαπόλυσης μπορεί να προκαλέσει πρόσθετη πίεση και, ως εκ τούτου, υποβάθμιση της ποιότητας. Αρκετοί παράγοντες, όπως είναι τα μέσα μεταφοράς καθώς και η διάρκεια και η κατάσταση του περιβάλλοντος πρέπει να λαμβάνονται υπόψη, προκειμένου να εντοπίζονται οι πιθανές αρνητικές επιπτώσεις στην απόδοση των αρσενικών.

Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των στείρων αρσενικών που εξαπολύονται περιλαμβάνουν την ικανότητα να επιβιώνουν και να διασπείρονται στη φύση, να βρίσκουν σύντροφο, να ερωτοτροπούν, να συζευγνύονται, να μεταφέρουν σπέρμα και τελικά να προκαλούν στειρότητα και αναστολή της ωοπαραγωγής στα συζευγμένα / ξανα – συζευγμένα θηλυκά

(Partridge et al., 1987). Αυτά τα ποιοτικά χαρακτηριστικά μπορούν να αξιολογηθούν κατά τη μαζική εκτροφή και πριν από την εξαπόλυσή τους, καθώς πράγματι υπάρχουν διαθέσιμα πρωτόκολλα για διαφορετικά είδη-στόχους (Butail et al., 2012; Dabiré et al., 2014; Madakacherry et al., 2014; Oliva et al., 2012). Τα περισσότερα από τα καθιερωμένα πρωτόκολλα αφορούν είδη με μακρά ιστορία στο SIT όπως οι μύγες των φρούτων, η μύγα τσετσέ (*Glossina austeni* Newst.) και το *Cochliomyia hominivorax* Coquerel (Dyck et al., 2005; Knipling, 1955; Knipling, 1979; Kniling, 1998; Krafur, 1998).

Από την επιτυχή χρήση της για πολλούς επιβλαβείς οργανισμούς στον γεωργικό τομέα, η τεχνική SIT στις μέρες μας, προτείνεται και αξιολογείται για την αντιμετώπιση επιβλαβών οργανισμών που είναι σημαντικοί για τη δημόσια υγεία, όπως τα κουνούπια (Dame et al., 2009; Kapranas et al., 2021). Οι προηγούμενες προσπάθειες για καταπολέμηση των κουνουπιών με την τεχνική SIT απέτυχαν λόγω της χαμηλής ανταγωνιστικότητας και απόδοσης των στερωμένων αρσενικών σε σύγκριση με τα άγρια (Helinski et al., 2008; Ponlawat et al., 2007; Renshaw et al., 1994). Οι πρόσφατες προσπάθειες στοχεύουν σε χωροκατακτητικά είδη κουνουπιών, όπως στο *Ae. (Stegomyia) albopictus* (Skuse) και στο *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus), που είναι κύριοι φορείς ασθενειών, όπως ο ιός Zika και ο δάγκειος πυρετός (Lees et al., 2020; Zheng et al., 2019). Έχουν αναπτυχθεί νέες τεχνικές μαζικής εκτροφής και στείρωσης που βελτιώνουν ουσιαστικά την ποιότητα των στερωμένων αρσενικών στα κουνούπια.

Τυποποιημένες δοκιμές ποιοτικού ελέγχου (Quality Control - QC) έχουν αναπτυχθεί για πολλά είδη εντόμων όπου έχει εφαρμοστεί η τεχνική της SIT (Balestrino et al., 2017). Οι δοκιμές ποιοτικού ελέγχου μπορεί να περιλαμβάνουν χαρακτηριστικά για την αξιολόγηση της εκκολαψιμότητας, της ικανότητας πτήσης, της αντοχής στο στρες, της μακροβιότητας και της ανταγωνιστικότητας σύζευξης με στόχο την πρόβλεψη της απόδοσης των στερωμένων εντόμων στη φύση. Η ποιότητα των στερωμένων κουνουπιών μπορεί να εκτιμηθεί σε συνθήκες εργαστηριακές, ημι-υπαίθριες και συνθήκες πεδίου (Bellini et al., 2010; Bellini et al., 2013). Οι τυπικές διαδικασίες QC στα περισσότερα προηγμένα προγράμματα εξαπόλυσης στερωμένων εντόμων

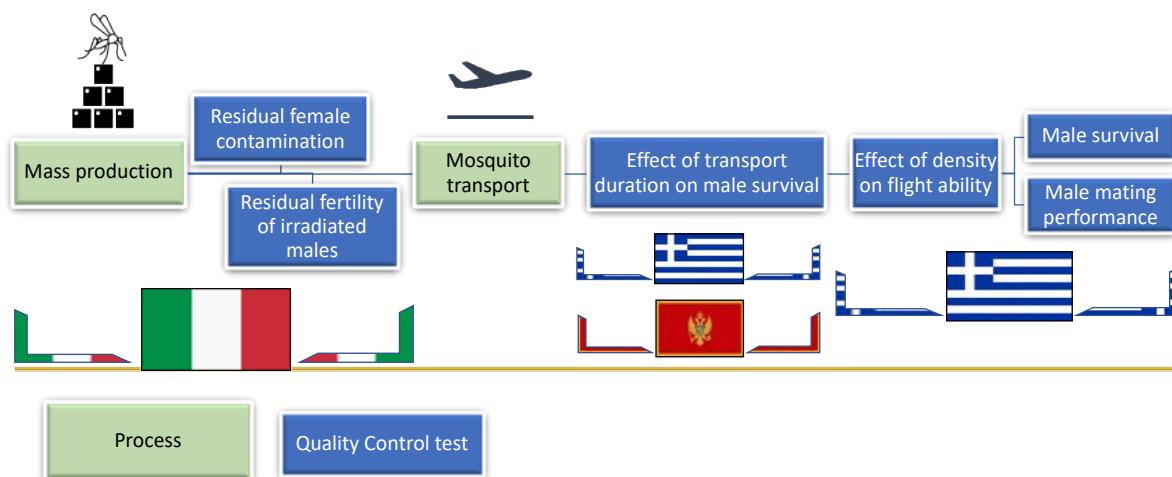
περιλαμβάνουν την ικανότητα πτήσης του εντόμου (Benedict et al., 2009; Carpenter et al., 2012; FAO/IAEA/USDA, 2019; Seck et al., 2015). Οι Balestrino και συν. (2007) ανέπτυξαν νέα έγκυρα εργαλεία που έχουν σχεδιαστεί για να αξιολογήσουν την ποιότητα του στειρωμένου αρσενικού *Ae. albopictus* με την παρατήρηση της ικανότητας πτήσης μετά από μεταβολή των συνθηκών του περιβάλλοντος.

Τα αποτελέσματα έδειξαν συσχέτιση της ικανότητας πτήσης, της επιβίωσης και της ικανότητας σύζευξης. Οι Culbert και συν. (2018) βελτίωσαν τη συσκευή, η οποία δοκιμάστηκε στο *Ae. aegypti* και στο *Ae. albopictus* και έδειξε υψηλά επίπεδα ευαισθησίας στην ανίχνευση των επιπτώσεων της ακτινοβολίας, της ψύξης και της συμπίεσης. Δεδομένου ότι υπάρχει έλλειψη πληροφοριών σχετικά με την ποιότητα των αρσενικών που μεταφέρονται αεροπορικώς από τις εγκαταστάσεις εκτροφής σε απομακρυσμένες περιοχές και χώρες με σκοπό την εξαπόλυση (Balatsos et al., 2021), η παρούσα εργασία παρουσιάζει μία σειρά δοκιμών για την αξιολόγηση της ποιότητας των μεταφερόμενων στειρωμένων αρσενικών. Πιο συγκεκριμένα, περιγράφονται οι πειραματικές διαδικασίες που ελέγχουν εάν η μεταφορά στο πλαίσιο ρεαλιστικών προγραμμάτων λειτουργίας της τεχνικής SIT επηρεάζει την ποιότητα των αρσενικών που εξαπολύονται.

5.3 Υλικά και μέθοδοι

Αρκετές δοκιμές QC οργανώθηκαν και πραγματοποιήθηκαν σε Ιταλία (εγκατάσταση μαζικής παραγωγής, Crevalcore, Μπολόνια), Ελλάδα και Μαυροβούνιο (Εικόνα 1). Αρχικά, αξιολογήθηκε η υπολειπόμενη γονιμότητα των παραγόμενων στειρωμένων αρσενικών (Ιταλία) και η επίδραση της μεταφοράς στην επιβίωση και στην ικανότητα πτήσης των αρσενικών (Ελλάδα, Μαυροβούνιο). Αφού βρέθηκε η βέλτιστη πυκνότητα μεταφοράς, αξιολογήθηκε περαιτέρω (Ελλάδα): (α) η επίδραση της σύζευξης, η έλλειψη τροφής και του νερού στην επιβίωση των αρσενικών και (β) η ανταγωνιστικότητα και συχνότητα σύζευξης των αρσενικών. Λόγω διαφορετικών τελωνειακών διαδικασιών μεταξύ των χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ) και τρίτων χωρών, η

διάρκεια της μεταφοράς και η επίδρασή της στο ποσοστό θνησιμότητας καταγράφηκε επίσης για τις μεταφορές από την Ιταλία προς την Ελλάδα, (χώρα ΕΕ) και προς το Μαυροβούνιο (χώρα εκτός ΕΕ) .



Εικόνα 5.1 Διάγραμμα ροής που περιγράφει τις διεργασίες από τη μαζική παραγωγή έως τη μεταφορά και τις αντίστοιχες δοκιμές ποιοτικού ελέγχου (QC). Οι σημαίες της Ιταλίας, της Ελλάδας και του Μαυροβουνίου υποδεικνύουν τις δραστηριότητες που πραγματοποιήθηκαν στα αντίστοιχα κράτη.

5.3.1 Πληθυσμοί κουνουπιών

5.3.1.1 Μαζική εκτροφή του *Ae. albopictus*

Τα αρσενικά που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμές προέρχονταν από ωά του *Ae. albopictus* που συλλέχθηκαν από την Ελλάδα (Βραυρώνα), το Μαυροβούνιο (Radonί'ci) και την Ιταλία (Ρίμινι) (GR, MNE και φυλή RER, αντίστοιχα) και εγκαταστάθηκαν σε αποικίες στο εργαστήριο BSL3 του Ιατρικού και Κτηνιατρικού Τμήματος του Περιβαλλοντικού και Γεωργικού Κέντρου «G. Nicolί» στο Crevalcore (CAA) (Μπολόνια, Ιταλία). Τα ενήλικα κουνούπια εκτρέφονταν σε σταθερές συνθήκες (28 ± 1 °C, 85 ± 5 % RH, 14:10 h L:D φωτοπερίοδος) σε κλωβούς plexiglass (40 cm × 40 cm × 40 cm) και με συνεχή παροχή 10% διάλυμα σακχαρόζης (Alphey et al, 2010). Τα θηλυκά τρέφονταν κάθε εβδομάδα με φρέσκο αίμα χοίρων, τροφοδοσία με μεμβράνη Hemotek® (συσκευή ελεγχόμενη από θερμοστάτη από τη Hemotek Ltd., Great Harwood

Business Zone, Blackburn) (Bellini et al., 2007). Τα ωά που εναποτίθονταν στο υγρό διηθητικό χαρτί αφαιρούνταν από τους πλεξιγκλάς κλωβούς ενηλίκων και τοποθετούνταν σε σφραγισμένα πλαστικά κουτιά για να επιτραπεί η εμβρυογένεση. Όταν χρειαζόταν, οι προνύμφες αφαιρούνταν με τυποποιημένες διαδικασίες εκκόλαψης και εκτροφής σε τυπικές συνθήκες σε λευκούς πλαστικούς δίσκους (41 cm x 31 cm x 11 cm) που περιείχαν 2 L απιονισμένου νερού· 4000 προνύμφες τρέφονταν με 2,0 mg/προνύμφη, δίαιτα της Διεθνούς Ατομικής Ενέργειας (ΔΟΑΕ, Βιέννη, Αυστρία) εμπλουτισμένη με μαγιά μπύρας (IAEA-BY) καθημερινά για τέσσερις ημέρες μετά την εκκόλαψη (Balestino et al., 2017).

5.3.1.2 Ελληνικός πληθυσμός *Ae. albopictus*

Εκτός από τα αρσενικά που μεταφέρθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σε μια σειρά πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκε και άγριος ελληνικός πληθυσμός που προήλθε από ωά που συλλέγονταν στην Αττική με χρήση ωοπαγίδων (φυλή Βραυρώνα, το ίδιο που χρησιμοποιείται για μαζική παραγωγή στην Ιταλία*, Bellini και συν. 2020. Ο πληθυσμός αυτός χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας χωρίς κάποια μεταχείριση (ούτε ακτινοβολήση ούτε μεταφορά). Οι ομάδες ωών συλλέγονταν καθημερινά και διατηρούνταν σφραγισμένες στο εργαστήριο από το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο (Κηφισιά, Ελλάδα) ή μεταφέρονταν στο εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Βόλος, Ελλάδα, απόσταση με αυτοκίνητο 3 ώρες από το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο). Πριν από τις δοκιμές, τα ωά είχαν βυθιστεί σε στάσιμο νερό βρύσης για εκκόλαψη και εκτροφή (Balatsos et al., 2021; Ioannou et al., 2021; Ioannou et al., 2021; Kythreoti et al., 2021). Οι δοκιμές ικανότητας πτήσης πραγματοποιήθηκαν στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, ενώ για τις δοκιμές επιβίωσης, ανταγωνιστικότητα και συχνότητας σύζευξης (επίδραση της σύζευξης, της έλλειψης τροφής και νερού στην επιβίωση του αρσενικού και στην απόδοση του αρσενικού στη σύζευξη) τα ωά (σε υποστρώματα ωοτοκίας) μεταφέρθηκαν στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

5.3.2 Διαχωρισμός φύλου και ακτινοβολία

Ο διαχωρισμός φύλου (αρσενικές νύμφες) από τους τρεις πληθυσμούς μαζικής εκτροφής (GR, MNE, RER), βασίζονταν στο μέγεθος των νυμφών και διεξαγόταν ο διαχωρισμός χρησιμοποιώντας μεταλλικά κόσκινα με τετράγωνες οπές 1400 μm (Bellini et al., 2007; Medici et al., 2011), 24–30 ώρες από την αρχή της νύμφωσης. Οι νύμφες συλλέγονταν και ωρίμαζαν για επιπλέον 24 ώρες πριν χωριστούν σε ομάδες των 5000 νυμφών και μεταφερθούν σε πλαστικά δοχεία χωρητικότητας 1000 mL, γεμάτα με 500 mL νερού βρύσης. Τα συγκεκριμένα δοχεία χρησιμοποιούνταν για τη μεταφορά των νυμφών στο Τμήμα Ιατρικής Φυσικής του Νοσοκομείου St. Anna (Cona, Ferrara, Ιταλία) για ακτινοβολήση και, στη συνέχεια, επέστρεφαν στο εργαστήριο για την έξοδο των ενηλίκων από το νυμφικό περίβλημα και τη συσκευασία τους με σκοπό την εξαπόλυση (Balestrino et al., 2010). Την ημέρα πριν από την ακτινοβολήση, καθώς και κατά τη μεταφορά πριν την ακτινοβολήση, οι νύμφες διατηρούνταν σε θερμομονωμένο πλαστικό δοχείο ώστε η θερμοκρασία να διατηρηθεί στους 20–22 °C, ενώ λίγα ήταν τα ενήλικα αρσενικά που προέκυψαν κατά τη μεταφορά των νυμφών προς/από την ακτινοβολία.

Η ακτινοβολήση των νυμφών πραγματοποιούνταν με ακτινοβολητή IBL 437 (CIS Bio International, Bagnols-sur-Ceze, Γαλλία) με γραμμική πηγή 50,9 TBq Cs-137 και κεντρικό ρυθμό δόσης 1,8 Gy/min (Balestrino et al., 2010). Οι ομάδες των νυμφών μεταφέρονταν με νερό σε τρυβλία Petri (διαμέτρου 12 cm) σε ειδικό δοχείο για ακτινοβολήση. Η δόση ακτίνων γάμμα των 35 Gy χορηγούνταν στις νύμφες, σε ηλικία περίπου 24-48 ωρών. Η κατανομή της δόσης μέσα στο καλάθι ελέγχονταν με τη χρήση GAFCHROMIC EBT3 αυτό-αναπτυσσόμενα δοσομετρικά φιλμ (International Specialty Products, Wayne, NJ, ΗΠΑ).

Για την εκτίμηση της αναλογίας φύλου από τις νύμφες, δείγμα με 300 νύμφες υποβάλλονταν σε διαχωρισμό φύλου με στερεομικροσκόπιο χρησιμοποιώντας μορφολογικούς χαρακτήρες (Becker et al., 2010).

5.3.3 Υπολειπόμενη μόλυνση του πληθυσμού με θηλυκά και ακτινοβολημένα αρσενικά

Η υπολειπόμενη γονιμότητα όλων των πληθυσμών ελέγχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες στο Ιατρικό και Κτηνιατρικό Τμήμα του Περιβαλλοντικού και Γεωργικού Κέντρου «G. Nicolì» στο Crevalcore (Μπολόνια, Ιταλία). Οι ακτινοβολημένες αρσενικές νύμφες μεταφέρονταν σε κλωβούς με μη ακτινοβολημένες θηλυκές νύμφες του ίδιου πληθυσμού. Για μάρτυρες χρησιμοποιούνταν μη ακτινοβολημένες αρσενικές νύμφες από κάθε πληθυσμό και μεταφέρονταν σε κλωβούς με παρθένα θηλυκά του ίδιου φύλου. Οι αρσενικές και οι θηλυκές νύμφες που χρησιμοποιούνταν για τα πειράματα ελέγχονταν και διαχωρίζονταν ανά φύλο με στερεοσκόπιο (Moorefield, 1951; Vargas, 1968).

Πραγματοποιούνταν διαφορετικές μεταχειρίσεις ανά φύλο και γονοτροφικό κύκλο χρησιμοποιώντας κλωβούς με 100 αρσενικά και 100 θηλυκά με σταθερή πρόσβαση σε διάλυμα σακχαρόζης 10%. Γεύματα αίματος προσφέρονταν στα θηλυκά την 7^η και την 14^η ημέρα από την εμφάνιση των ενηλίκων (δύο γονοτροφικοί κύκλοι). Τα ωά που τοποθετούνταν σε διηθητικό χαρτί συλλέγονταν πέντε ημέρες μετά την παροχή αίματος, στέγνωσαν και αποθηκεύονταν σε υψηλή υγρασία για τουλάχιστον μία εβδομάδα πριν την εκκόλαψη. Τα ωά μετρούνταν στο στερεοσκόπιο και εκκολάπτονταν όλη τη νύχτα σε διάλυμα βακτηριακού διαλύματος (Balestrino et al., 2010). Μετά τη βύθιση, τα χαρτιά των αυγών ελέγχονταν στο στερεοσκοπικό μικροσκόπιο για να μετρηθούν τα εκκολαφθέντα και τα μη εκκολαφθέντα ωά.

5.3.4 Επίδραση της μεταφοράς στα στειρωμένα αρσενικά

5.3.4.1 Επίδραση της διάρκειας μεταφοράς στην επιβίωση

Η μεταφορά στειρωμένων αρσενικών και των αντίστοιχων πληθυσμών από τη μονάδα μαζικής παραγωγής του Ιατρικού και Κτηνιατρικού Τμήματος του Περιβαλλοντικού και Γεωργικού Κέντρου «G. Nicolì» στο Crevalcore

(Crevalcore, Ιταλία) στην Αθήνα (Ελλάδα) και στην Ποντογκόριτσα (Μαυροβούνιο) διεξάγονταν αεροπορικώς. Τα ενήλικα άτομα στέλνονταν σε παγωμένα κουτιά αφρού (περίπου 1500 στειρωμένα αρσενικά/κουτί: θερμοκρασία 8–14 °C) με παγοκύστες και καλυμμένα με δίχτυ και βρεγμένο βαμβάκι από διάλυμα ζάχαρης 10% (Balatsos et al., 2021). Για την αξιολόγηση της άμεσης επίδρασης της διάρκειας της μεταφοράς, κατά την άφιξη καταμετρούνταν ο αριθμός των νεκρών ενηλίκων αρσενικών ανά αποστολή και στις δύο χώρες. Η περίοδος μεταφοράς για το Μαυροβούνιο ήταν Μάιος–Ιούνιος 2018 και για την Ελλάδα Αύγουστος–Σεπτέμβριος 2018.

5.3.4.2 Επίδραση της πυκνότητας κατά τη μεταφορά στην ικανότητα πτήσης

Στειωμένα αρσενικά (πληθυσμός GR) μεταφέρονταν από την Ιταλία στην Ελλάδα σε τρεις διαφορετικές πυκνότητες: 1200, 1500 και 1900 αρσενικά/παγωμένο κουτί αφρού. Ως ομάδα ελέγχου, χρησιμοποιούνταν μη ακτινοβολημένα και μη μεταφερθέντα αρσενικά της ίδιας ηλικίας (3-4 ημέρες) που προέρχονταν από την ελληνική αποικία που διατηρείται στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο. Κατά την άφιξη, τα στειωμένα αρσενικά μεταφέρονταν σε σταθερές εργαστηριακές συνθήκες (25 ± 2 °C, 80% RH) στο εργαστήριο του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου και παρέχονταν διάλυμα ζάχαρης 10% για χρονικό διάστημα πέντε ωρών. Τα αρσενικά - μάρτυρες διατηρούνταν στις ίδιες συνθήκες.

Οι δοκιμές της ικανότητας πτήσης διεξάγονταν με τη χρήση συσκευής αναρρόφησης και με τη μεθοδολογία που περιγράφεται από τους Balestrino et al. (2017). Σε κάθε σωλήνα αναρρόφησης μεταφέρονταν είκοσι αρσενικά από την κάθε μία από τις τέσσερις πυκνότητες καθώς και τα αρσενικά - μάρτυρες του εργαστηρίου. Ο χρόνος αναρρόφησης ορίστηκε στα 30 λεπτά, ενώ πραγματοποιούνταν 10 και 15 επαναλήψεις για τα στειωμένα αρσενικά και τον μάρτυρα, αντίστοιχα. Αυτή η δοκιμασία μπορεί να αξιολογήσει συνθήκες πιθανής βιολογικής καταπόνησης (stress) και επιλέχθηκε ως μια εύκολη και γρήγορη μέθοδος συγκριτικά με άλλες μεθόδους (Culbert et al., 2018).

5.3.5 Επιβίωση μετά τη μεταφορά και επίδοση σύζευξης

Τα πειράματα διεξάγονταν σε σταθερές συνθήκες (25 °C, 65% RH, 14:10 L:D) στο εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας στο Π.Θ. Η φωτόφαση ορίστηκε από τις 07:00 έως τις 21:00 με 45 λεπτά αύξηση/μείωση της έντασης φωτός την αυγή και το σούρουπο αντίστοιχα.

5.3.5.1 Επίδραση της σύζευξης, της έλλειψης τροφής και νερού στην επιβίωση των αρσενικών

Επίδραση της σύζευξης στη μακροβιότητα των αρσενικών

Για να προσδιοριστεί η επίδραση της σύζευξης στη μακροβιότητα του αρσενικού, τόσο στα άγρια παρθένα όσο και στα στειρωμένα δίνονταν η δυνατότητα σύζευξης με άγρια παρθένα θηλυκά. Για να γίνει αυτό, 40 είτε στειρωμένα είτε άγρια αρσενικά τοποθετούνταν σε ένα κλουβί BugDorm® μαζί με 40 παρθένα θηλυκά. Τρία τέτοια κλουβιά (επαναλήψεις) εγκαθιστούνταν για κάθε αρσενικό τύπο. Τα ενήλικα άτομα και των δύο φύλων μεταφέρονταν σε κοινό κλουβί για έξι ημέρες για να επιτραπεί η σύζευξη. Την έβδομη ημέρα, 50 αρσενικά κάθε κατηγορίας τυχαία επιλεγμένα (και από τις τρεις επαναλήψεις) μεταφέρονταν με αναρρόφηση σε μεμονωμένα κλουβιά, έχοντας πρόσβαση σε διάλυμα ζάχαρης 5%. Πενήντα αρσενικά και των δύο τύπων (άγρια και στειρωμένα) που δεν είχαν πρόσβαση σε θηλυκά διατηρούνταν σε παρόμοιες συνθήκες πυκνότητας συνωστισμού (80 αρσενικά ανά κλουβί) για έξι ημέρες και αποτελούσαν στις δοκιμές τους αντίστοιχους μη συζευγμένους μάρτυρες. Τα μεμονωμένα κλουβιά ενηλίκων κατασκευάστηκαν από ένα διαφανές πλαστικό κύπελλο χωρητικότητας 400 mL που τοποθετήθηκε ανάποδα και στερεώθηκε στο καπάκι ενός τρυβλίου Petri διαμέτρου 9 cm. Ένα πλαϊνό παράθυρο (3 cm x 5 cm) χρησίμευε για αερισμό, ενώ μια μικρή οπή στο επάνω μέρος του κλουβιού δημιουργούσε την είσοδο στο κλουβί. Τροφή για τα ενήλικα (διάλυμα ζάχαρης 5%) παρεχόταν από ένα βαμβακερό φυτίλι που ένωνε τη βάση του κλουβιού με την κάτω βάση του τρυβλίου Petri. Η θνησιμότητα των αρσενικών καταγραφόταν καθημερινά μέχρι το θάνατο του τελευταίου ατόμου.

5.3.5.2 Η επίδραση της έλλειψης τροφής και νερού στα ποσοστά επιβίωσης των ενηλίκων

Δοκιμάστηκαν οι ακόλουθες τρεις μεταχειρίσεις: (α) έλλειψη τροφής (αρσενικά που διατηρούνται μόνο με νερό), (β) έλλειψη τροφής και νερού (δεν προσφέρεται ούτε τροφή ούτε νερό στα αρσενικά) και (γ) μάρτυρας (προσφέρεται στα αρσενικά τροφή και νερό από διάλυμα ζάχαρης). Τα στείρωμένα αρσενικά τοποθετούνταν σε μεμονωμένα κλουβιά (βλέπε παραπάνω) κατά την άφιξή τους στο εργαστήριο. Στα ίδια κλουβιά τοποθετούνταν και άγρια αρσενικά της ίδιας ηλικίας (τεσσάρων ημερών). Τα στείρωμένα και άγρια αρσενικά κατανέμονταν τυχαία σε μία από τις τρεις μεταχειρίσεις (50 άτομα ανά μεταχείριση). Η θνησιμότητα καταγράφηκε δύο φορές την ημέρα μέχρι το θάνατο του τελευταίου ατόμου.

5.3.6 Εκτίμηση δυνατότητας και συχνότητας σύζευξης αρσενικού

5.3.6.1 Ανταγωνιστικότητα σύζευξης και ημερήσια πρότυπα της συχνότητας σύζευξης άγριων και στείρωμένων αρσενικών

Προκειμένου να επιλεγεί το κατάλληλο χρονικό διάστημα της ημέρας ώστε να εκτιμηθεί η συχνότητα σύζευξης του αρσενικού καθώς και η ανταγωνιστικότητα σύζευξης και τα ημερήσια πρότυπα της συχνότητας σύζευξης άγριων και στείρωμένων αρσενικών καταγράφηκε ο ημερήσιος ρυθμός σύζευξης σε πειραματική διάταξη «χωρίς επιλογή». Πριν από τη δοκιμή, παρθένα στείρωμένα αρσενικά, παρθένα άγρια αρσενικά και παρθένα άγρια θηλυκά διατηρούνταν χωριστά σε τυπικούς κλωβούς BugDorm-4F2222 με περίπου 80 ενήλικα άτομα ανά κλουβί με παροχή διαλύματος ζάχαρης 5%. Όλα τα ενήλικα κουνούπια ήταν αναπαραγωγικά ώριμα (ηλικίας 6-12 ημερών). Ο χώρος σύζευξης ήταν διαφανές κλωβός Plexiglass® (15 cm x 15 cm x 15 cm) με τροφή για ενήλικα άτομα (διάλυμα ζάχαρης 5%). Σε κάθε Plexiglass τοποθετούνταν ένα θηλυκό το βράδυ της δοκιμής για εγκλιματισμό στο περιβάλλον και ένα αρσενικό λίγο πριν την παρατήρηση.

Ο συνολικός αριθμός των συζεύξεων, η διάρκεια και η λανθάνουσα

[154]

περίοδος της πρώτης σύζευξης (χρόνος μέχρι την πρώτη σύζευξη) και κάθε επόμενης (από την ώρα λήξης της προηγούμενης σύζευξης μέχρι την έναρξη της επόμενης), παρατηρήθηκαν για τρεις χρονικές περιόδους που καθορίστηκαν κατά τη διάρκεια της φωτοφάσης (08:00–12:00, 12:01–16:00, 16:01–20:00). Για κάθε χρονική περίοδο πραγματοποιήθηκαν 30 επαναλήψεις. Προκειμένου να συγκριθεί η ανταγωνιστικότητα σύζευξης μεταξύ των άγριων και των στειρωμένων αρσενικών συνδυάστηκαν τα δεδομένα από τις τρεις χρονικές περιόδους τόσο για την επιτυχία της σύζευξης όσο και για την λανθάνουσα περίοδο και την διάρκεια σύζευξης.

5.3.6.2 Ανταγωνιστικότητα σύζευξης αρσενικών

Η ανταγωνιστικότητα σύζευξης των στειρωμένων έναντι των άγριων αρσενικών διεξήχθη χρησιμοποιώντας παρθένα αρσενικά ηλικίας πέντε έως δέκα ημερών. Κάθε δοκιμή περιλάμβανε παρθένα στειρωμένα αρσενικά, παρθένα άγρια αρσενικά και παρθένα άγρια θηλυκά σε αναλογία 1:1:1. Οι δοκιμές διεξάγονταν κλωβούς Plexiglass (βλ. παραπάνω) από τις 18:00 έως τις 20:00 με βάση προηγούμενη παρατήρηση σχετικά με τα καθημερινά πρότυπα της δραστηριότητας σύζευξης. Τα αρσενικά χρωματίζονταν με φθορίζουσα (μη τοξική) σκόνη πριν από τη σύζευξη. Πραγματοποιήθηκαν 98 επαναλήψεις και οι συζεύξεις καταγράφονταν οπτικά από έμπειρο προσωπικό. Στις μισές επαναλήψεις χρωματίζονταν με σκόνη ενός χρώματος το στειρωμένο αρσενικό και στις άλλες μισές χρωματίζονταν το άγριο αρσενικό. Ως εκ τούτου, πραγματοποιήσαμε (α) 49 επαναλήψεις με ένα θηλυκό/ένα άχρωμο στειρωμένο αρσενικό/ένα χρωματισμένο άγριο αρσενικό και (β) 49 επαναλήψεις με ένα θηλυκό/ένα χρωματισμένο στειρωμένο αρσενικό/ένα άχρωμο άγριο αρσενικό. Το άγριο θηλυκό τοποθετούνταν στον χώρο των δοκιμών μία ημέρα πριν από την ημέρα της δοκιμής για εγκλιματισμό ενώ τα αρσενικά (στειρωμένα και άγρια) εισάγονταν μαζί στην αρχή του πειράματος. Καταγράφηκε η διάρκεια και η λανθάνουσα περίοδος της πρώτης σύζευξης (χρόνος μεταξύ της εισαγωγής των αρσενικών στην αρένα μέχρι την πρώτη σύζευξη) και για κάθε επόμενο συνδυασμό που σχηματίστηκε (ώρα λήξης της προηγούμενης σύζευξης μέχρι την ώρα έναρξης μιας νέας σύζευξης με το ίδιο άτομο).

5.4 Στατιστική ανάλυση

Το γενικό γραμμικό μοντέλο (GLM) ακολουθούμενο από τη δοκιμή HSD του Tukey για post-hoc συγκρίσεις μέσων όρων χρησιμοποιήθηκε για τη δοκιμή διαφορών μεταξύ των πληθυσμών (GR, MNE, RER) στην υπολειπόμενη μόλυνση του πληθυσμού με θηλυκά μετά τον μηχανικό διαχωρισμό των φύλων των νυμφών. Ομοίως, η επίδραση του πληθυσμού των κουνουπιών, του επίπεδου ακτινοβολίας και ο γονοτροφικός κύκλος στον ρυθμό εκκόλαψης αυγών διερευνήθηκαν με GLM. Τα υπολειπόμενα ποσοστά γονιμότητας διορθώθηκαν με τον τύπο διόρθωσης του Abbott (WHO, 2020). Ο one-way ANOVA χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθεί η επίδραση της πυκνότητας των κουνουπιών κατά τη μεταφορά στην ικανότητα πτήσης. Η ανάλυση επιβίωσης χρησιμοποιήθηκε για να προσδιοριστεί και να συγκριθεί η μακροβιότητα των άγριων και στερωμένων αρσενικών στις διαφορετικές διατροφικές συνθήκες. Ο έλεγχος log-rank (Mantel–Cox) χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των δύο αρσενικών τύπων. Οι επιδράσεις του αρσενικού τύπου (άγριο, στερωμένο) και της σύζευξης (σύζευξη και μη) στη μακροβιότητα του αρσενικού αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας το μοντέλο ανάλογων κινδύνων Cox (Cox proportional hazards model). Διεξήχθησαν συγκρίσεις κατά ζεύγη χρησιμοποιώντας τον έλεγχο log rank (Mantel–Cox). Η δοκιμασία χι τετράγωνο (χ^2) χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των ποσοστών σύζευξης μεταξύ άγριων και στερωμένων αρσενικών σε δοκιμές σύζευξης χωρίς επιλογή και σε δοκιμές σύζευξης επιλογής. Για όλες τις αναλύσεις το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο $\alpha = 0,05$. Η ανάλυση δεδομένων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας IBM SPSS 25 (IBM Corp., Armonk, NY). Το Ms Excel χρησιμοποιήθηκε για τη σχεδίαση γραφημάτων.

5.5 Αποτελέσματα

5.4.1 Υπολειπόμενη μόλυνση του πληθυσμού με θηλυκά

Η μόλυνση με θηλυκά στον πληθυσμό όπου υπήρχαν αρσενικές νύμφες, μετά από τον μηχανικό διαχωρισμό του φύλου, δεν διέφερε στις διαφορετικές φυλές ($F_{2, 14} = 0.425$, $p = 0,662$). Το μέσο ποσοστό ($\pm$ SE) της υπολειπόμενης

[156]

παρουσίας των θηλυκών για πληθυσμούς RER, GR και MNE ήταν 1.62% (± 0.32), 1.25% (± 0.26) και 1.18% (± 0.39) του συνολικού αριθμού νυμφών.

5.4.2 Υπολειπόμενη γονιμότητα αρσενικών

Δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στη γονιμότητα των θηλυκών του *Ae. albopictus* ως συνάρτηση τις φυλής ($F_{2, 81} = 1.5$, $p = 0.23$) και του γονοτροφικού κύκλου που εξετάστηκε ($F_{1, 81} = 0.03$, $p = 0.86$). Ωστόσο, η ακτινοβολήση των αρσενικών είχε σημαντική επίδραση στη γονιμότητα των θηλυκών ($F_{1, 81} = 3508$, $p < 0.001$). Η συνολική μέση ($\pm$ SD) υπολειπόμενη γονιμότητα που μετρήθηκε με εκκόλαψη ωών ήταν σημαντικά χαμηλότερη (0.008 ± 0.007) από την καταγεγραμμένη γονιμότητα στην ομάδα του μάρτυρα που δεν υποβλήθηκε σε ακτινοβολήση (0.831 ± 0.089) (Πίνακας 1).

Πίνακας 5.1 Υπολειπόμενη γονιμότητα (διόρθωση Abbott) ωών από θηλυκά *Ae. albopictus* που συζεύχτηκαν με αρσενικά που ακτινοβολήθηκαν ως νύμφες στα 35 Gy. Φυλές: Ελλάδα (GR), Μαυροβούνιο (MNE) και Ιταλία (RER).

Φυλή	Μεταχειρίσεις	N	Συνολικός αριθμός ελεγμένων ωών	Μέση Υπολειπόμενη Γονιμότητα (Εκκολαπτόμενα ωά/Εναποτεθημένα ωά $\pm$ SE)	
				Μάρτυρας	Ακτινοβολημένα
RER	1	10	30,927	0.834 ± 0.059	0.007 ± 0.008
	2	10	28,978	0.842 ± 0.096	0.006 ± 0.003
GR	1	5	6378	0.820 ± 0.187	0.013 ± 0.012
	2	5	6530	0.768 ± 0.053	0.008 ± 0.008
MNE	1	6	14,398	0.841 ± 0.043	0.010 ± 0.003
	2	7	19,776	0.864 ± 0.070	0.009 ± 0.003
Γενικά	-	43	106,987	0.831 ± 0.089	0.08 ± 0.007

5.5.3 Επίδραση της διάρκειας της μεταφοράς στην επιβίωση στείρων αρσενικών

Ο χρόνος μεταφοράς των αρσενικών στο Μαυροβούνιο ήταν περίπου δύο ημέρες, ενώ για την Ελλάδα περίπου μία ημέρα. Η θνησιμότητα των αρσενικών που μεταφέρθηκαν στο Μαυροβούνιο ήταν σημαντικά υψηλότερη (t -test, $p < 0,05$) σε σχέση με τα άτομα που μεταφέρθηκαν στην Ελλάδα (Πίνακας 5.2).

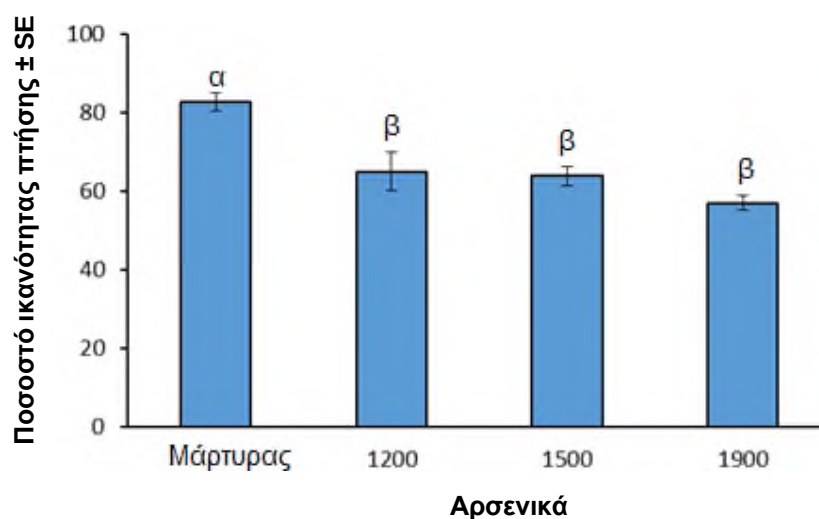
Πίνακας 5.2 Η επίδραση της χρονικής διάρκειας της μεταφοράς στη θνησιμότητα στα υπό ακτινοβολία αρσενικά κουνούπια (περίπου 1500 στείρων αρσενικά/κιβώτιο).

Διάρκεια μεταφοράς (Ωρες)	Χώρα Προορισμού	Νο αποστολής (Μεταχείριση)	Νο Αρσενικών Απεσταλμένα/ Μεταχείριση	Μέσος όρος Νο Αρσενικών ($\pm$ SE)	Θνησιμότητα κατά τη μεταφορά (%)	Μέση θνησιμότητα ($\pm$ SE) ^a
48 $\pm$ 2	Μαυροβούνιο	1	15.000	17.400 $\pm$ 993	78,16	39,83 $\pm$ 10,01 ^a
		2	22.000		53,31	
		3	20.000		89,38	
		4	15.000		72,65	
		5	15.000		15,83	
		6	21.000		13,72	
		7	15.000		32,92	
		8	16.000		9,41	
		9	20.000		14,55	
		10	15.000		8,39	
22 $\pm$ 2	Ελλάδα	1	15.000	13.880 $\pm$ 884	12,7	15,66 $\pm$ 2,75 ^b
		2	18.000		16,8	
		3	15.000		15,1	
		4	19.000		24,9	
		5	12.000		5,0	
		6	15.000		10,4	
		7	17.000		24,7	

^a Οι μέσοι όροι που έχουν το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά (Welch's t -test, $p = 0.05$)

5.5.4 Επίδραση της πυκνότητας κατά τη μεταφορά στην ικανότητα πτήσης των στερημένων αρσενικών.

Η αναλογία των αρσενικών που ξεκίνησαν να πετούν ήταν υψηλότερη στο μάρτυρα σε σύγκριση με τα στερημένα, ανεξάρτητα από την πυκνότητα των κουνουπιών κατά τη μεταφορά ($F_{3, 41}=16,2$, $p < 0,001$). Δεν βρέθηκαν διαφορές μεταξύ των τριών πυκνοτήτων μεταφοράς (Διάγραμμα 5.2, δοκιμές Tukeys' HSD, $p > 0,05$).

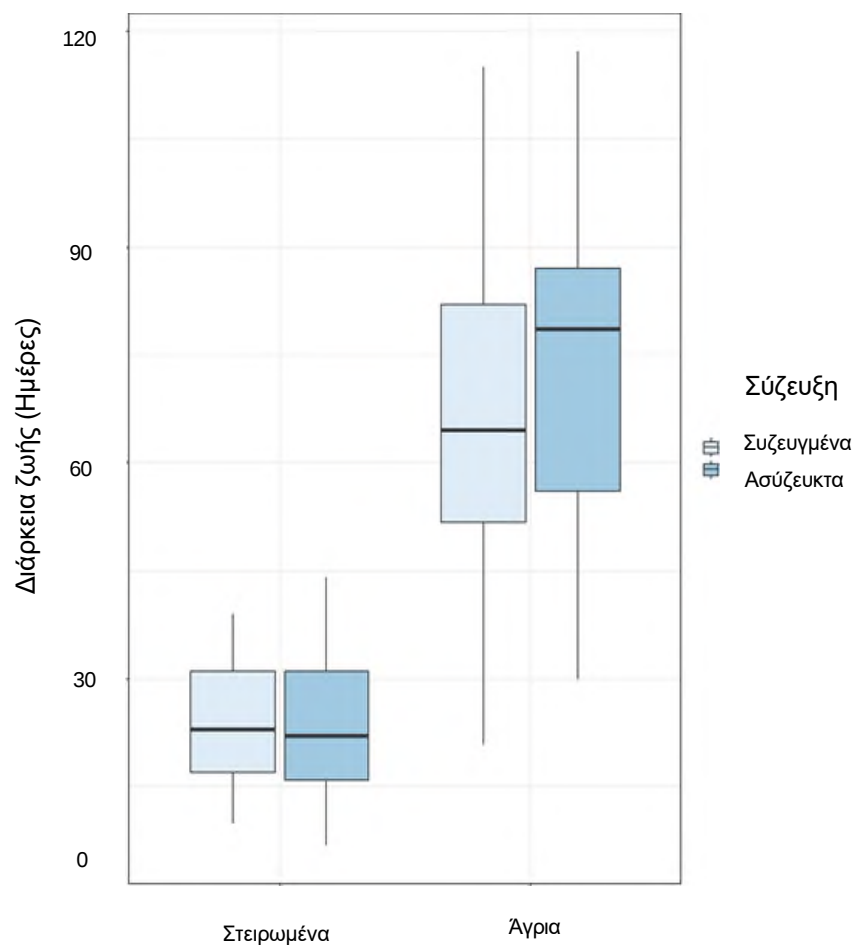


Εικόνα 5.2 Ικανότητα πτήσης των στερημένων αρσενικών *Aedes albopictus* που αποστέλλονται σε διαφορετικές πυκνότητες και των άγριων μη απεσταλμένων, γόνιμων αρσενικών του πληθυσμού μάρτυρα. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές (Tukey's HSD test, $p < 0,005$).

5.5.5 Επίδραση της σύζευξης, της τροφής και της έλλειψης νερού στην επιβίωση των αρσενικών μετά τη μεταφορά

Τόσο τα άγρια όσο και τα στερημένα αρσενικά είχαν παρόμοια διάρκεια ζωής υπό συνθήκες έλλειψης τροφής (log rank test, $p > 0,05$) (Πίνακας 5.3). Ωστόσο, τα άγρια αρσενικά ήταν μακροβιότερα από τα στερημένα κάτω από έλλειψη τροφής και νερού (log rank test, $p < 0,05$) (Πίνακας 5.4).

Ανεξάρτητα από την σύζευξη, η διάρκεια ζωής των άγριων αρσενικών ήταν παραπλήσια με εκείνη των στερωμένων (Πίνακας 5.5 & Διάγραμμα 5.3). Από την άλλη πλευρά, η σύζευξη δεν είχε εμφανή επίδραση στη μακροβιότητα των αρσενικών. Ομοίως, η αλληλεπίδραση μεταξύ τύπου αρσενικού και σύζευξης δεν ήταν σημαντική, υποδεικνύοντας ότι τα αποτελέσματα της σύζευξης ήταν παρόμοια στους δύο τύπους αρσενικούς.



Διάγραμμα 5.3 Τα θηκογράμματα δείχνουν την επίδραση του αρσενικού τύπου (άγριο ή στερωμένο) και την κατάσταση σύζευξης (συζευγμένο ή παρθένο) στη μακροβιότητα των αρσενικών.

Πίνακας 5.3 Απόκριση (χρόνος μέχρι τον θάνατο) άγριων και στείρωμένων αρσενικών *Aedes albopictus* υπό συνθήκες έλλειψης τροφής (μόνο νερό).

Είδος Αρσενικού	Μέση διάρκεια ζωής (ημέρες)	Τεταρτημόρια (ημέρες ± SE)		
		25	50	75
Άγριο (n = 50)	5,40 ± 0,56 ^α	6,00 ± 0,83	4,00 ± 0,50	3,00 ± 0,38
Στείρωμένο (n = 50)	5,98 ± 0,32 ^α	7,00 ± 0,35	6,00 ± 0,50	5,00 ± 0,49

Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές (pairwise comparisons, log rank test, $p > 0,05$).

Πίνακας 5.4 Ανταπόκριση (χρόνος μέχρι τον θάνατο) άγριων και στείρωμένων αρσενικών *Aedes albopictus* υπό συνθήκες έλλειψης τροφής και νερού.

Είδος Αρσενικού	Μέση διάρκεια ζωής (ώρες)	Τεταρτημόρια (ημέρες ± SE)		
		25	50	75
Άγριο (n = 50)	36,24 ± 1,47 ^α	48,00 ± 1,25	36,00 ± 1,69	24,00 ± 0,00
Στείρωμένο (n = 50)	31,92 ± 1,35 ^β	36,00 ± 1,55	36,00 ± 1,40	24,00 ± 1,84

Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές (pairwise comparisons, log rank test, $p > 0,05$).

Πίνακας 5.5 Μεταβλητές του μοντέλου ανάλογων κινδύνων του Cox για την επίδραση του αρσενικού τύπου και της σύζευξης στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων

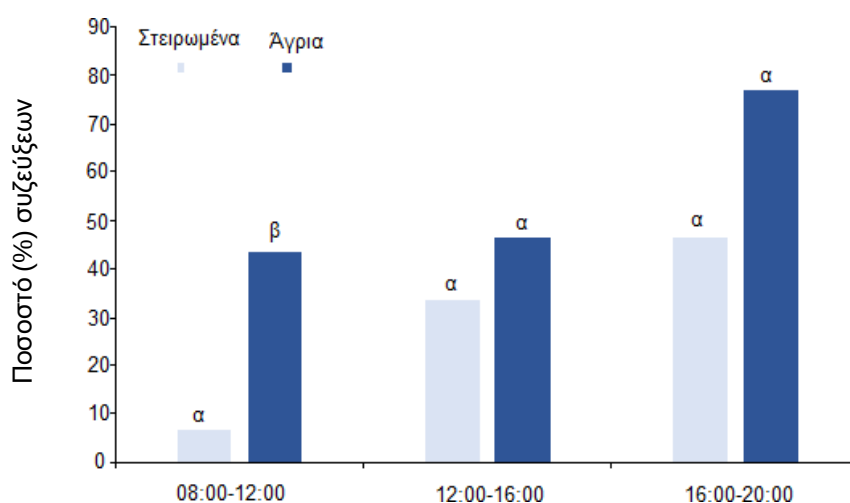
Πηγή παραλλακτικότητας	β^1	Τυπικό σφάλμα ²	$\text{Exp}(\beta)^3$	p
Τύπος αρσενικού	-3,95	0,39	0,01	<0,001
Σύζευξη	-0,26	0,22	0,76	0,23
Σύζευξη x Τύπος αρσενικού	0,52	0,30	1,69	0,08

¹ β εκτιμώμενοι συντελεστές στο μοντέλο παλινδρόμησης ανάλογων κινδύνων του Cox

5.5.6 Επίδοση σύζευξης αρσενικών μετά τη μεταφορά

5.5.6.1 Ημερήσιοι ρυθμοί της συχνότητας σύζευξης από άγρια και στείρωμένα αρσενικά

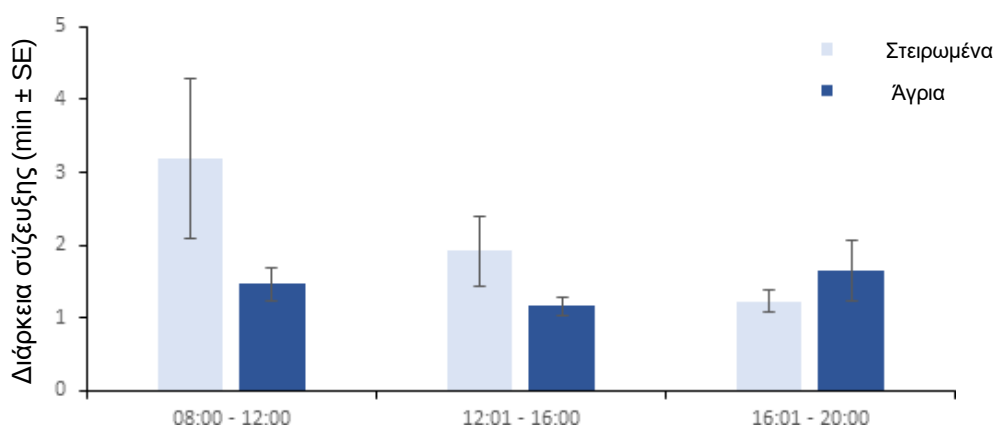
Τόσο τα άγρια όσο και τα στείρωμένα αρσενικά εμφάνισαν υψηλότερα ποσοστά σύζευξης αργά το απόγευμα και τις βραδινές ώρες (Εικόνα 4). Τα άγρια αρσενικά συζευγνύονται με υψηλότερους ρυθμούς νωρίς το πρωί και αργά το απόγευμα σε σύγκριση με τα στείρωμένα ($\chi^2 = 10,75$ και $5,71$ αντίστοιχα, $df=1$, $p<0,05$). Οι αναλογίες σύζευξης ήταν παρόμοιες μεταξύ άγριων και στείρωμένων αρσενικών το μεσημέρι ($\chi^2=1,11$, $df=1$, $p>0,05$). Συνολικά, τα άγρια αρσενικά συζευγνύονται με υψηλότερους ρυθμούς από τα στείρωμένα, ανεξάρτητα από τη χρονική περίοδο.



Διάγραμμα 5.4 Ημερήσιοι ρυθμοί σύζευξης για άγρια και στείρωμένα αρσενικά όταν στα άγρια παρθένα θηλυκά βρέθηκαν σε πειραματική διάταξη χωρίς επιλογή. Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές σε κάθε χρονικό διάστημα ($p < 0,05$).

Η διάρκεια σύζευξης τόσο για τα άγρια όσο και για τα στείρωμένα αρσενικά και για τις τρεις χρονικές περιόδους δίνεται στο Διάγραμμα 5.5. Παρά την τάση για μεγαλύτερη διάρκεια σύζευξης κατά τις πρωινές ώρες για τα

στερωμένα αρσενικά, δεν αναφέρθηκαν διαφορές όταν και τα τρία χρονικά διαστήματα συμπεριλήφθηκαν στο ανάλυση ($t\text{-test} = 0,049$, $df = 178$, $p < 0,05$).



Διάγραμμα 5.5 Επίδραση της ώρας της ημέρας στην διάρκεια σύζευξης για άγρια και στερωμένα αρσενικά όταν τα άγρια παρθένα θηλυκά βρέθηκαν σε πειραματική διάταξη χωρίς επιλογή.

5.5.6.2 Ανταγωνιστικότητα σύζευξης

Συνδυάζοντας τα δεδομένα των τριών παραπάνω χρονικών περιόδων, διαπιστώθηκε ότι τα άγρια αρσενικά συζευγνύονται σε υψηλότερη (σχεδόν διπλάσια) αναλογία σε σύγκριση με τα στερωμένα κάτω από την πειραματική διάταξη χωρίς επιλογή. Συνολικά ελήφθησαν υπόψη 90 επαναλήψεις για κάθε ομάδα αρσενικών. Πενήντα και 26 θηλυκά από τα 90 συζεύχτηκαν με τα άγρια και τα στερωμένα αρσενικά, αντίστοιχα (55% και 28% συζευγνύονται για κάθε αρσενική ομάδα, αντίστοιχα, Πίνακας 6). Η λανθάνουσα περίοδος της πρώτης σύζευξης (χρόνος μέχρι την πρώτη σύζευξη) ήταν ουσιαστικά αλλά όχι σημαντικά μεγαλύτερη για τα στερωμένα αρσενικά σε σύγκριση με τα άγρια. Ομοίως, η διάρκεια σύζευξης ήταν παρόμοια και στους δύο τύπους αρσενικών.

Πίνακας 6.6 Ανταγωνιστικότητα σύζευξης στείρων και άγριων αρσενικών του *Aedes albopictus* σε πειράματα χωρίς επιλογή με άγρια παρθένα θηλυκά.

Είδος αρσενικού	N	Σύζευξη (%)	Λανθάνουσα περίοδος πρώτης σύζευξης (min ± SE)	Διάρκεια (min ± SE)
Άγριο	90	55,56 ^α	75,18 ± 10,07 ^α	1,46 ± 0,20 ^α
Στείρωμένο	90	28,89 ^β	105,34 ± 15,07 ^α	1,64 ± 0,23 ^α
Test		$\chi^2=13,1$	$t\text{-test} = 1,704$	$t\text{-test} = 0,545$
df	-	1	74	74
p	-	<0,001	0,093	0,587

Οι τιμές σε κάθε στήλη που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά $p \geq 0,05$

Η σύζευξη με άγριο είτε με στείρωμένο αρσενικό καταγράφηκε στο 71,4% των δοκιμαστικών κλωβών (98 συνολικά). Τα παρθένα θηλυκά συζευγνύονται σε υψηλότερα ποσοστά με άγρια μη στείρωμένα αρσενικά σε σύγκριση με τα στείρωμένα (Πίνακας 7.7). Η λανθάνουσα περίοδος της πρώτης σύζευξης (χρόνος μέχρι την πρώτη σύζευξη) σύζευξης ήταν μικρότερη για τα στείρωμένα αρσενικά σε σύγκριση με τα άγρια, ενώ η διάρκεια σύζευξης ήταν παρόμοια και για τους δύο τύπους αρσενικών.

Πίνακας 7.7 Ανταγωνιστικότητα σύζευξης στειρωμένων και άγριων αρσενικών του *Aedes albopictus* σε συνολικά 98 επαναλήψεις.

Είδος αρσενικού	N	Σύζευξη (%)	Λανθάνουσα περίοδος	
			πρώτης σύζευξης (min ± SE)	Διάρκεια (min ± SE)
Άγριο	48	67,6 ^α	37,23 ± 4,38 ^α	0,85 ± 0,11 ^α
Στερωμένο	23	32,4 ^β	23,22 ± 3,84 ^β	0,78 ± 0,07 ^α
Test		$\chi^2 = 8,8$	$t\text{-test} = 1,95$	$t\text{-test} = 0,40$
df	-	1	69	69
p	-	<0,01	0,02	0,32

Οι τιμές σε κάθε στήλη όταν ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά $p \geq 0.05$

5.6 Συζήτηση

Η ποιότητα των στειρωμένων αρσενικών είναι μια σημαντική παράμετρος για την επιτυχία ενός προγράμματος SIT. Σε αυτή τη μελέτη αξιολογήθηκαν παράμετροι που σχετίζονται με την ποιότητα των στειρωμένων αρσενικών του *Ae. albopictus*. Επί του παρόντος, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για τη διαχείριση των αστικών πληθυσμών του *Ae. albopictus* με τη χρήση της τεχνικής SIT και η συγκεκριμένη μελέτη ταυτίζεται με τις πρωτοβουλίες του Διεθνούς Οργανισμού Ατομικής Ενέργειας (IAEA), του έργου INFRAVEC2 και της Δράσης AIM-COST CA17108 με στόχο την ενίσχυση της ικανότητας ενσωμάτωσης της τεχνικής SIT στην αποτελεσματική διαχείριση του χωροκατακτητικού κουνουπιού *Ae. albopictus*. Σε αυτή τη μελέτη, έγινε δειγματοληψία από διαφορετικούς πληθυσμούς κουνουπιών ως ωά από τις περιοχές εξαπόλυσης, στάλθηκαν για μαζική εκτροφή και στείρωση σε εξειδικευμένη εγκατάσταση στην Ιταλία και δοκιμάστηκαν σε περιοχές στην Ελλάδα και το Μαυροβούνιο. Ως εκ τούτου, η επίδραση της στείρωσης και της μεταφοράς μαζικής εκτροφής έχουν ληφθεί υπόψη στις δοκιμές. Μια σημαντική πτυχή για το πρόγραμμα SIT είναι ο διαχωρισμός του φύλου (χωρισμός των

αρσενικών από τα θηλυκά) των εντόμων. Στη συγκεκριμένη μελέτη, η μέθοδος μηχανικού διαχωρισμού φύλου που εφαρμόστηκε επέτρεψε μια υπολειμματική παρουσία θηλυκών περίπου 1,35% ($\pm 0,21$), η οποία εξακολουθεί να είναι ελαφρώς υψηλότερη σε σχέση με τα μεγάλα προγράμματα SIT (WHO, 2020). Επιπλέον, ο αντίκτυπος των στερωμένων θηλυκών που εξαπολύονται έχει μελετηθεί πρόσφατα από τους Dumont & συν. (2022) καθώς όταν οι ιοί δεν κυκλοφορούν, η εξαπόλυση στερωμένων θηλυκών δεν είναι πραγματικά πρόβλημα, ενώ είναι ένα ζήτημα όταν κυκλοφορούν ιοί (π.χ. ο δάγκειος πυρετός ή ο ιός Chikungunya).

Η απόδοση των στερωμένων αρσενικών επηρεάζεται από έναν συνδυασμό παραγόντων: συνθήκες εκτροφής, διαδικασία προσδιορισμού φύλου, δόση, μέθοδος ακτινοβολίας και συσκευασία κατά τη μεταφορά. Η μαζική εκτροφή των κουνουπιών *Aedes* μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στην ανάπτυξη που επηρεάζουν το μέγεθος του σώματος, την απόκριση στην περιβαλλοντική πίεση, στη μειωμένη απόδοση σύζευξης των αρσενικών καθώς και στην ικανότητα γονιμοποίησης (Jong et al., 2016; Richardson et al., 2013; Ross et al., 2019; Year et al., 2013). Οι αποικίες του *Ae. albopictus* μπορούν να διατηρήσουν την ακεραιότητα και την ποιότητα εάν υπάρχει επαρκής γενετική διαφοροποίηση στις συνθήκες μαζικής εκτροφής που προκύπτουν από βελτιστοποιημένες συνθήκες εκτροφής (Li et al., 2021). Η βέλτιστη δόση ακτινοβολίας προσδιορίζεται πειραματικά από τις καμπύλες δόσης-απόκρισης (Balestrino et al., 2010). Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης επιβεβαιώνουν το υψηλό επίπεδο στείρωσης που επιτεύχθηκε σε ενήλικα αρσενικά κουνούπια που ακτινοβολήθηκαν με δόση 35 Gy στην ηλικία των 24-40 ωρών. Οι ευρωπαϊκοί πληθυσμοί του *Ae. albopictus* που δοκιμάστηκαν έχουν παρόμοια ευαισθησία στη δόση ακτινοβολίας γάμμα που χρησιμοποιείται. Ως εκ τούτου, φαίνεται ότι η ακτινοβολία προκαλεί παρόμοιες επιδράσεις σε διαφορετικά στελέχη του *Ae. albopictus*.

Η μεταφορά απαιτεί την ψύξη και τη συσκευασία των στερωμένων αρσενικών σε υψηλές πυκνότητες, γεγονός που μπορεί να έχει σημαντικά αρνητική επίδραση στην ποιότητά τους (Chung et al., 2018; Helinski et al., 2008). Τα ευρήματα της μελέτης μας δείχνουν ότι η μεταφορά που διαρκεί δύο

ημέρες ή περισσότερο, όπως αυτή από την Ιταλία στο Μαυροβούνιο, έχει σημαντική άμεση αρνητική επίδραση στην επιβίωση στα στείρωμένα αρσενικά κουνούπια, σε σύγκριση με μικρότερη χρονικά μεταφορά, όπως αυτή από την Ιταλία στην Ελλάδα (20 –24 ώρες). Αυτό το αποτέλεσμα υπογραμμίζει την ανάγκη για μια εναρμονισμένη διαδικασία σε διεθνές πλαίσιο για την διακίνηση στείρωμένων αρσενικών κουνουπιών με συμφωνία των εμπλεκόμενων αρχών (Bellini et al., 2022; Collins et al., 2022).

Επιπλέον, τα μεταφερόμενα στείρωμένα αρσενικά έχουν μειωμένη ικανότητα πτήσης σε σύγκριση με τα άγρια, όπως εκτιμάται από τις συσκευές πτήσης που χρησιμοποιούνται σε παρόμοιες δοκιμές (Balestrino et al., 2017). Από την άλλη πλευρά, η πυκνότητα συνωστισμού 1200-1900 αρσενικών ανά εμπορευματοκιβώτιο δεν επηρέασε το ποσοστό επιβίωσης και την ικανότητα πτήσης των κουνουπιών που αποστέλλονται, κάτι που είναι θετικό για τα προγράμματα SIT. Ομοίως, η πυκνότητα συνωστισμού δεν επηρέασε σημαντικά την επιβίωση των στείρωμένων αρσενικών του είδους *Anopheles arabiensis* (Culbert et al., 2020).

Τα στείρωμένα αρσενικά που αποστέλλονταν στην Ελλάδα ζούσαν για πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα από τα άγρια σε συνθήκες πλήρους έλλειψης τροφής. Το συγκεκριμένο τεστ χρησιμεύει ως δείκτης των διατροφικών αποθεμάτων που υπάρχουν στα αρσενικά μετά την εξαπόλυσή τους (FAO/IAEA/USDA, 2019). Από την άλλη, η παροχή νερού, που αποτελεί πιο ρεαλιστικό σενάριο σε φυσικές συνθήκες, οδήγησε σε ίσα ποσοστά επιβίωσης στείρωμένα και άγρια κουνούπια, γεγονός που δείχνει ότι, παρά την πίεση που προκαλείται από τη μεταφορά, τα στείρωμένα αρσενικά μπορούν ακόμα να επιβιώσουν για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Η ερμηνεία των δοκιμών που αξιολογούν την αποτελεσματικότητα σύζευξης των στείρωμένων αρσενικών κουνουπιών θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη τη συμπεριφορά σύζευξης καθώς και τις συνθήκες μαζικής εκτροφής. Η συμπεριφορά σύζευξης του *Ae. albopictus* χαρακτηρίζεται από αρκετά μικρά εναέρια σμήνη με αρσενικά άτομα όπου λαμβάνει χώρα ο ανταγωνισμός και επιτρέπει την επιλογή από τα θηλυκά (Cator et al., 2021; Oliva et al., 2013).

Στις δοκιμές διαπιστώθηκε ότι τα άγρια αρσενικά ήταν πιο πρόθυμα

να συζευχθούν σε σχέση με τα στειρωμένα αρσενικά. Ωστόσο, το συγκεκριμένο εύρημα μπορεί να μην είναι αντιπροσωπευτικό της απόδοσης των αρσενικών με τα άγρια θηλυκά στο πεδίο, επειδή, στα συγκεκριμένα πειράματα, τα θηλυκά εκτρέφονταν στο εργαστήριο και οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε περιορισμό (Parker et al., 2020).

Ωστόσο, όταν τα στειρωμένα αρσενικά κουνούπια ανταγωνίζονταν άμεσα τα άγρια για σύζευξη με τα θηλυκά, τα άγρια έχουν διπλάσια επιτυχία σύζευξης. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στη στείρωση, στη μαζική εκτροφή και στον χειρισμό/αποστολή. Η μεγαλύτερη λανθάνουσα περίοδος της πρώτης σύζευξης (χρόνος μέχρι την πρώτη σύζευξη) ήταν παρόμοια για τα μη στειρωμένα αρσενικά σε σύγκριση με τα στειρωμένα. Η επιλογή για ταχεία σύζευξη των αρσενικών κουνουπιών σε συνθήκες μαζικής εκτροφής υψηλής πυκνότητας έχει αποδειχθεί νωρίτερα (Parker et al., 2020). Κάτω από τις συνθήκες τεχνητής εκτροφής, το φαινόμενο της «εξημέρωσης - domestication» θα μπορούσε να οδηγήσει σε σημαντικές αλλαγές της συμπεριφοράς και των φυσιολογικών χαρακτηριστικών. Αυτό το φαινόμενο είναι ευρέως γνωστό όταν τα έντομα παράγονται μαζικά κάτω από εργαστηριακές συνθήκες που είναι διαφορετικές (υψηλός συνωστισμός) από εκείνες στις οποίες το είδος έχει προσαρμοστεί στο πεδίο (Parker et al., 2020) και αναφορές σε αυτές.

Προηγούμενες μελέτες για την καθιέρωση μεθόδων ποιοτικού ελέγχου για στειρωμένα αρσενικά του *Ae. albopictus* περιλαμβάνουν πτητικές δοκιμές με συσκευή αναρρόφησης για την αξιολόγηση της ανοχής σε μηχανικές καταπονήσεις και καταπονήσεις ξήρανσης, καθώς και στην ικανότητα σύζευξης του αρσενικού, ωστόσο δεν συνέκριναν άμεσα την ανταγωνιστικότητα σύζευξης στειρωμένων και άγριων αρσενικών (Zheng et al., 2019). Οι δοκιμές της συγκεκριμένης μελέτης δείχνουν ότι τα στειρωμένα αρσενικά κουνούπια έχουν μειωμένη απόδοση σε σύγκριση με τα μη στειρωμένα, αλλά θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή, ειδικά στην αξιολόγηση παραγόντων, όπως η ανταγωνιστικότητα σύζευξης. Οι δοκιμές ανταγωνιστικότητας σύζευξης που πραγματοποιούνται σε πεδία μεγάλης έκτασης μπορεί να είναι πιο αντιπροσωπευτικές της πραγματικής κατάστασης (Bellini et al., 2013). Για το *Ae. albopictus*, προηγούμενη μελέτη (Cator et al., 2021) προσδιόρισε ότι ο

μέσος δείκτης CIS (δείκτης ικανότητας επαγωγής στειρότητας ή δείκτης ανταγωνιστικότητας) στο πεδίο ποικίλλει έντονα σε χώρο και χρόνο, και κυμαίνεται από 0,02 έως 0,37, που δείχνει ότι τα στειρωμένα αρσενικά ήταν 3 έως 50 φορές λιγότερο ανταγωνιστικά από τα άγρια. Οι Madakacherry & συν. (2014) διαπίστωσαν ότι τα στειρωμένα αρσενικά ήταν εξίσου ανταγωνιστικά με τα μη ακτινοβολημένα αντίστοιχά τους και μια αναλογία 5:1 ήταν επαρκής για να μειώσει, αλλά όχι να εξαλείψει, τη γονιμότητα των θηλυκών πληθυσμών, ανεξάρτητα από το μέγεθος του κλουβιού.

Προηγούμενες μελέτες και τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται εδώ υποδεικνύουν ότι ακτινοβολημένο αρσενικό *Ae. albopictus* μπορεί να ανταγωνιστεί αποτελεσματικά τα γόνιμα αρσενικά, υποδεικνύοντας ότι τόσο η ποσότητα στην δόση κατά την ακτινοβολία όσο και το στάδιο ζωής στο οποίο τα αρσενικά ακτινοβολούνται είναι σχεδόν βέλτιστα (Balestrino et al., 2010; Bellini et al., 2021; Oliva et al., 2014). Ωστόσο, δεδομένου του αυξανόμενου ενδιαφέροντος για την υιοθέτηση της τεχνολογίας SIT κατά του κουνουπιού τίγρης παγκοσμίως και της σημασίας του τυποποιημένου ποιοτικού ελέγχου, απαιτούνται ακόμη περισσότερες μελέτες για την εκδήλωση στερεότυπων συμπεριφορών των στειρωμένων.

Σε αυτή τη μελέτη, οι δοκιμές διεξήχθησαν το 2018, πριν από την έναρξη των εβδομαδιαίων απελευθερώσεων στην Ελλάδα με στόχο τον έλεγχο της ποιότητας των ακτινοβολημένων στειρωμένων αρσενικών κουνουπιών (Balatsos et al., 2021). Επομένως, είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι οι διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου μας δεν πραγματοποιήθηκαν κοντά στις εγκαταστάσεις μαζικής παραγωγής αλλά στην περιοχή-στόχο μιας πιλοτικής μελέτης SIT. Αυτό μπορεί να σχετίζεται περισσότερο με τις μελέτες ποιοτικού ελέγχου που διεξάγονται στις εγκαταστάσεις μαζικής εκτροφής, καθώς περιλαμβάνουν πιέσεις που σχετίζονται με τη μεταφορά και το χειρισμό.

5.7 Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα του παρόντος κεφαλαίου υποδεικνύουν ξεκάθαρα ότι είναι δύσκολη η μαζική εξαπόλυση όταν οι εγκαταστάσεις παραγωγής στείρωμένων αρσενικών είναι πολύ μακριά από το σημείο απελευθέρωσης και η μεταφορά στείρωμένων αρσενικών διαρκεί περισσότερο από 24 ώρες με αεροπορικά ταξίδια. Η πανδημία COVID-19 και οι επιπτώσεις της στις μεταφορές (καθυστερήσεις ή ακυρώσεις πτήσεων) υπογραμμίζει περαιτέρω τη σημασία της καθιέρωσης μιας αποτελεσματικής και γρήγορης μεταφοράς και έγκαιρης παράδοσης των στείρωμένων αρσενικών. Απαιτούνται διαδικασίες QC για να διασφαλιστεί η αποτελεσματικότητα του ελέγχου της τεχνικής SIT όταν απαιτούνται αποστολές στείρωμένων αρσενικών. Οι δοκιμές QC θα πρέπει να διεξάγονται πριν από την αποστολή (στις εγκαταστάσεις παραγωγής) και μετά τη μεταφορά (στην περιοχή απελευθέρωσης) για τον ακριβή διαχωρισμό των επιπτώσεων της ακτινοβολήσης/εκτροφής/χειρισμού και των επιπτώσεων της μεταφοράς στην απόδοση των ανδρών.

Για την διαχείριση της εξαπόλυσης των στείρωμένων αρσενικών σε μακρινές περιοχές, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη η ανάπτυξη φυλής *Ae. albopictus* με μαζική εκτροφή. Για να δημιουργηθεί μία τέτοια φυλή, θα πρέπει να συμπεριληφθούν πολλαπλασιαστικά (γενετικό υλικό) από διαφορετικές χώρες. Προφανώς, η συμβατότητα του νέου καθιερωμένου στελέχους έναντι των τοπικών πληθυσμών-στόχων SIT θα πρέπει να αξιολογηθεί με εκτεταμένες δοκιμές QC. Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν πρωτόκολλα εργαστηριακού ποιοτικού ελέγχου για στείρωμένα αρσενικά κουνούπια ώστε να γίνουν γνωστές, για πρώτη φορά, οι επιπτώσεις της αποστολής στην περιοχή στόχο στην απόδοση των στείρωμένων αρσενικών. Τα αποτελέσματα παρέχουν χρήσιμες βασικές πληροφορίες για την εφαρμογή της τεχνικής SIT όταν οι εγκαταστάσεις παραγωγής στείρωμένων αρσενικών δεν βρίσκονται κοντά στο σημείο απελευθέρωσης και απαιτείται αποστολή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΖΕΥΞΗΣ ΣΤΑ ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ *CULEX RIPIENS* F. *RIPIENS* ΚΑΙ ΤΟΥ *CULEX RIPIENS* F. *MOLESTUS*

6.1 Περίληψη

Το *Culex ripiens* είναι ο κύριος διαβιβαστής του Ιού του Δυτικού Νείλου καθώς και άλλων μολυσματικών ασθενειών που επηρεάζουν εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως. Η γνώση της βιολογίας των δύο βιοτύπων του, του *Culex ripiens* f. *ripiens* και του *Culex ripiens* f. *molestus*, είναι σημαντική προκειμένου να γίνει κατανοητός ο ρόλος τους στη μετάδοση των ασθενειών και να αναπτυχθούν αποτελεσματικές στρατηγικές καταπολέμησης. Σκοπός του παρόντος κεφαλαίου είναι να διαπιστωθεί η επίδραση της σύζευξης (παρθένα, συζευγμένα) χωρίς γεύμα αίματος στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων αρσενικών και θηλυκών των βιοτύπων του *Culex ripiens*, *Cx. ripiens* f. *ripiens* και *Cx. ripiens* f. *molestus*. Για κάθε βιότυπο και σε συνάρτηση με το φύλο και τη σύζευξη δημιουργήθηκαν πίνακες ζωής και υπολογίσθηκε το προσδόκιμο ζωής. Χρησιμοποιήθηκαν ενδημικοί πληθυσμοί κουνουπιών της Θεσσαλίας σε ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες, θερμοκρασία (25 °C), υγρασία (65 ± 5% RH) και φωτοπερίοδος (14:10 L:D). Στο *Cx. ripiens* f. *ripiens* μόνο το φύλο αλλά όχι η σύζευξη είχε σημαντική επίδραση στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων. Στο *Cx. ripiens* f. *molestus* το φύλο, η σύζευξη και η αλληλεπίδρασή τους είχαν σημαντική επίδραση στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων. Τα αρσενικά του *Cx. ripiens* f. *ripiens* είχαν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής ανεξάρτητα αν συζεύχθηκαν ή όχι σε σχέση με τα θηλυκά καθώς και μεγαλύτερο προσδόκιμο ζωής ενώ στο *Cx. ripiens* f. *molestus* μεγαλύτερη διάρκεια ζωής είχαν τα παρθένα άτομα και των δύο φύλων. Στο *Cx. ripiens* f. *molestus* το προσδόκιμο ζωής ήταν μικρότερο σε σχέση με το *Cx. ripiens* f. *ripiens* σε όλες τις περιπτώσεις εκτός από την περίπτωση των συζευγμένων αρσενικών. Συνεπώς, οι βιότυποι του *Cx. ripiens* έχουν διαφορετική βιολογία και ανταπόκριση στη σύζευξη, γεγονός

που πιθανώς επηρεάζει τόσο τη μετάδοση των ασθενειών όσο και τις στρατηγικές καταπολέμησής τους.

6.2 Εισαγωγή

Η μελέτη της βιολογίας του *Culex pipiens* παρουσιάζει ενδιαφέρον εξαιτίας της γεωγραφικής του κατανομής σε τροπικές και υποτροπικές χώρες, και της ικανότητας του να μεταφέρει μολυσματικές ασθένειες που έχουν σοβαρό αντίκτυπο στη δημόσια υγεία και κατ' επέκταση στην οικονομία (βλέπε Κεφάλαιο 1). Θηλυκά του γένους *Cx. pipiens* τρέφονται με το αίμα σπονδυλωτών ξενιστών και είναι οι κύριοι διαβιβαστές μολυσματικών ασθενειών όπως ο ιός του Δυτικού Νείλου (ΙΔΝ), ο ιός Usutu (USUV) (Martinet et al., 2019; Muñoz et al., 2012; Rizzoli et al., 2015). Επίσης, μεταδίδουν εκτός από τον ΙΔΝ, φιλαριάσεις (π.χ. διροφιλαρίαση σκύλων) και το πλασμώδιο που προκαλεί ελονοσία στα πτηνά (*Plasmodium vivax*) (Huijben et al., 2007; Martinet et al., 2019; Otranto et al., 2013).

Η σημασία της μελέτης της βιολογίας του *Cx. pipiens* απορρέει από τις επιπτώσεις του ΙΔΝ στην υγεία του ανθρώπου. Οι περισσότεροι άνθρωποι που μολύνονται από τον ιό ή δεν αρρωσταίνουν ή παρουσιάζουν ήπια συμπτώματα, όμως σε ποσοστό <1% ο ιός προσβάλλει το κεντρικό νευρικό σύστημα και προκαλεί κυρίως εγκεφαλίτιδα ή μηνιγγίτιδα. Άτομα μεγαλύτερης ηλικίας και κυρίως άνω των 50 ετών κινδυνεύουν περισσότερο να νοσήσουν, όπως επίσης και άτομα με ανοσοκαταστολή και χρόνια υποκείμενα νοσήματα. Τις τελευταίες δεκαετίες είναι εμφανείς οι συνέπειες της εξάπλωσης του ΙΔΝ στην Ευρώπη και στη βόρεια Αμερική (Brugman et al., 2018; Chancey et al., 2015). Το 2010 αναφέρθηκαν στην Ελλάδα 262 περιπτώσεις εκ των οποίων οι 35 ήταν θανατηφόρες (HCDCP, 2018). Τα έτη 2010-2014 και 2017-2021 καταγράφηκαν κρούσματα από τον ΙΔΝ στη χώρας μας, κατά τους καλοκαιρινούς και φθινοπωρινούς μήνες καθώς και το 2018 και μετέπειτα εμφανίστηκε ραγδαία αύξηση των κρουσμάτων με 312 ασθενείς από τους οποίους οι 44 κατέληξαν από οξεία άσηπτη μηνιγγοεγκεφαλίτιδα, ενώ το 2019 προσβλήθηκαν 227 και κατέληξαν οι 35 (HCDCP, 2018).

Οι στρατηγικές για τη μείωση του πληθυσμού των κουνουπιών βασίζονται κυρίως στη χρήση εντομοκτόνων. Σε διάφορες χώρες οι πληθυσμοί των κουνουπιών αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα, γεγονός που μειώνει την αποτελεσματικότητά τους (Rivero et al., 2011). Συνεπώς, είναι επιτακτική ανάγκη η ανάπτυξη αποτελεσματικών μεθόδων καταπολέμησης με αξιοποίηση της γνώσης σχετικά με τη βιολογία τους. Ένα από τα πιο δύσκολα προβλήματα στην ανάπτυξη αυτών των προγραμμάτων καταπολέμησης είναι η εκτίμηση της μακροβιότητας των πληθυσμών του *Cx. pipiens* (Cook et al., 2006; 2008; Styer et al., 2007).

Σχετικά με τη βιολογία του *Cx. pipiens*, αυτό αποτελείται από δύο βιότυπους, τον *Culex pipiens f. pipiens* και τον *Culex pipiens f. molestus*. Οι δύο βιότυποι έχουν διαφορές στα συμπεριφορικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά, αλλά είναι μορφολογικά δυσδιάκριτοι (βλέπε Κεφάλαιο 1). Η μορφή «*pipiens*» περιγράφεται ως ευρυγαμική, ετεροδύναμη (με ικανότητα διάπαυσης), ορνιθοφιλή, αναυτογενής και αναπτύσσεται σε υπέργειους οικοτόπους. Η μορφή «*molestus*» είναι στενογαμική, ανθρωπόφιλη, αυτογενής, δεν διαπαύει και προτιμά υπόγεια υδάτινα σώματα με υψηλή οργανική ουσία για την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή (Vinogradova, 2000).

Ιστορικά, ο βιότυπος *Cx. pipiens f. molestus* έχει αναφερθεί στο μετρό του Λονδίνου το 1940 (Shute, 1951) όπου υπήρχε συνωστισμός ανθρώπων για να προφυλαχθούν από τον πόλεμο, όπως έχει αναφερθεί και σε άλλες ευρωπαϊκές πόλεις σε μέρη κάτω από το έδαφος από τη δεκαετία του 1920s (Jobling, 1938; Mattingly, 1951). Αντίθετα, ο βιότυπος *Cx. pipiens f. pipiens* έχει αναφερθεί πως ζει πάνω από το έδαφος. Με την αστικοποίηση ο βιότυπος *Cx. pipiens f. molestus* βρέθηκε και σε επίγεια μέρη (de Boissezon, 1929; Hecht, 1932; Huff, 1929; Legendre, 1931; Roubaud, 1929; Wesenberg-Lund, 1920) όπου συνυπάρχει και υβριδίζεται με τον *Cx. pipiens f. pipiens*.

Ειδικότερα, πληθυσμοί του *Cx. pipiens f. pipiens* βρέθηκαν στη βόρεια Ευρώπη σε υπέργεια και υπόγεια μέρη, ενώ πληθυσμοί του *Cx. pipiens f. molestus* βρέθηκαν στη νότιο Ευρώπη μόνο σε κλειστά υπόγεια (Chevillon,

1995; Di Luca, 2016). Οι υπέργαιοι πληθυσμοί του *Cx. pipiens* αποτελούνται από πληθυσμούς *Culex pipiens* f. *pipiens*, *Cx. pipiens* f. *molestus* καθώς και από ανάμεικτους πληθυσμούς (Edwards, 1921; Harbach, 2012), γεγονός που έχει επιβεβαιωθεί με γενετικές μεθόδους (Chevillon et al., 1995; Di Luca et al., 2016; Fonseca et al., 2004; Gomes et al., 2009; Gomes et al., 2013; Gomes et al., 2013; Oso' rio et al., 2012).

Πρόσθετες μελέτες σε διαφορετικά περιβάλλοντα έδειξαν πως άτομα από καθαρές σειρές του *Cx. pipiens* f. *molestus* και του *Cx. pipiens* f. *pipiens* και υβρίδιά τους βρέθηκαν στις ίδιες θέσεις παγίδευσης, με τον αριθμό των υδριδίων τους να είναι μικρότερος σε αναλογία (Gomes et al., 2013; Oso' rio et al., 2014). Έρευνα πεδίου στην Ιταλία έδειξε πως η σύζευξη του *Cx. pipiens* f. *molestus* σε περιορισμένους χώρους περιορίζει τον υβριδισμό (Spielman, 1964). Η διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών πάνω και κάτω από το έδαφος μειώνεται από βορρά προς νότο εξαιτίας του θερμότερου χειμώνα με συνέπεια το *Cx. pipiens* f. *molestus* να επιβιώνει σε εκθετημένα μέρη (Chevillon et al., 1998; Mattingly et al., 1951).

Εξωτερικοί παράγοντες, όπως η θερμοκρασία έχουν επίδραση στην οικολογία και στη βιολογία των κουνουπιών, καθώς επηρεάζουν άμεσα την περίοδο ανάπτυξης, το μέγεθος, τη γονιμότητα, τη μακροζωία των ενηλίκων, τη θνησιμότητα (Andreadis et al., 2014; Ciota et al., 2014; Delatte et al., 2009; Rueda et al., 1990; Shelton, 1973) καθώς και την ικανότητα των κουνουπιών να μεταδώσουν μολυσματικές ασθένειες (Delatte et al., 2009; Mohammed & Chadee, 2011; Shelton, 1973). Η πλειονότητα των μελετών που ασχολούνται με την εξαρτώμενη από τη θερμοκρασία ανάπτυξη των εντόμων έχει διεξαχθεί σε σταθερές θερμοκρασίες (Spanoudis et al., 2019).

Αν και το *Cx. pipiens* με τους βιοτύπους του παρουσιάζουν σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία των ανθρώπων λίγες είναι οι έρευνες που έχουν ασχοληθεί με τη μακροβιότητά τους. Ειδικότερα, έχει μελετηθεί στο εργαστήριο η μακροβιότητα του *Cx. pipiens* f. *pipiens* υπό σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (Andreadis et al., 2014) και του *Cx. pipiens* f. *molestus*

(Spanoudis et al., 2015). Οι Papadopoulos και συν. (2016) μελέτησαν εργαστηριακά τη μακροβιότητα ενηλίκων θηλυκών του *Cx. pipiens* που μεταφέρθηκαν από το πεδίο στο εργαστήριο. Η συγκριτική μελέτη των δύο βιοτύπων δεν έχει πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα.

Εκτός από τη μακροβιότητα υπάρχουν και μελέτες για το *Cx. pipiens* f. *pipiens* σχετικά με τη συμπεριφορά σύζευξης, παράγοντας που σχετίζεται με τη μακροβιότητα και την επηρεάζει. Τα κουνούπια συμπεριλαμβανομένου του *Cx. pipiens* f. *pipiens* συζευγνύονται σε σμήνη με τη συγκέντρωση αρσενικών σε φυσικά ενδιαιτήματα και παρουσιάζουν ανταγωνισμό μεταξύ τους για τη σύζευξη με το θηλυκό (Dabire et al., 2013; Fawaz et al., 2014; Service, 1994).

Τα αρσενικά κουνούπια κατά την διάρκεια της σύζευξης εκτός από σπέρμα μεταφέρουν στα θηλυκά και συνοδά εκκρίματα που ενεργοποιούν το σπέρμα και ενισχύουν την κινητικότητα και την αποθήκευσή του, αλλά επίσης επηρεάζουν τη συμπεριφορά των θηλυκών, την αναπαραγωγική φυσιολογία και τη γονιμότητά τους. Τα συνοδά εκκρίματα περιέχουν πρωτεΐνες σπερματικού υγρού (SFPs) που σε συνδυασμό με ορμόνες, υδατάνθρακες, άλατα και λιπίδια συνθέτουν το σπερματικό υγρό (Poiani, 2006). Σε αντίθεση με τα περισσότερα θηλυκά έντομα που συζευγνύονται περισσότερες από μία φορές στη ζωή τους (Arnqvist & Nilsson, 2000), τα θηλυκά του *Cx. pipiens* συζευγνύονται μόνο μία φορά (Tripet et al., 2003).

Η μεταφορά σπέρματος κατά τη σύζευξη μπορεί επίσης να επηρεάσει και άλλες λειτουργίες των θηλυκών κουνουπιών. Για παράδειγμα, στο *Ae. aegypti*, έχει αποδειχθεί πως τα προϊόντα των αρσενικών βοηθητικών αδένων επάγουν αυξημένη ωοτοκία (Hiss & Fuchs, 1972; Klowden & Chambers, 1991; Leahy & Craig, 1965; Villarreal et al., 2018), αύξηση της διατροφής των θηλυκών με γεύμα αίματος (Villarreal et al., 2018), αύξηση του ρυθμού πέψης του αίματος (Downe et al., 1975) και αύξηση της μακροβιότητας των θηλυκών (Helinski & Harrington, 2011). Στο «οικιακό» κουνούπι, *Cx. pipiens*, η εκχύλιση αρσενικών βοηθητικών αδένων σε ενήλικα θηλυκά επάγει τη μονογαμία των θηλυκών (Craig et al., 1967).

6.3 Υλικά και μέθοδοι

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Π.Θ. από το φθινόπωρο του 2016 έως το καλοκαίρι του 2019. Οι πειραματικές συνθήκες που επικρατούσαν περιγράφονται στην Ενότητα 2.1.

Χρησιμοποιήθηκαν πληθυσμοί των βιοτύπων του είδους *Cx. pipiens* f. *pipiens* και *Cx. pipiens* f. *molestus* από την περιοχή του Βόλου και της Λάρισας (Θεσσαλία). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στην F₂ – F₆ γενεά με ταυτόσημες εργαστηριακές συνθήκες. Η εκτροφή στα ανήλικα και ενήλικα στάδια πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην Ενότητα 2.2.

Μελετήθηκε η διάρκεια ζωής ενηλίκων των δύο φύλων και για τους δύο βιότυπους του *Cx. pipiens* με και χωρίς σύζευξη. Ειδικότερα, για τη μελέτη των συζευγμένων ατόμων εισήχθησαν σε ένα κλωβό εκτροφής BugDorm-4F2222 Insect Rearing Cage 32,5 x 32,5 x 32,5 cm 40 αρσενικές και 40 θηλυκές νύμφες (σύνολο 80) οι οποίες τοποθετήθηκαν σε πλαστική λεκάνη διαμέτρου 7cm που περιείχε 500ml νερού. Προστέθηκε διάλυμα ζάχαρης 10%w/v και τα άτομα που εξέρχονταν από το νυμφικό περίβλημα παρέμειναν στον κλωβό έως την ηλικία των 6 ημερών για να πραγματοποιήσουν σύζευξη. Την 7^η ημέρα της ενήλικης ζωής επιλέχτηκαν 25 ενήλικα από κάθε φύλο και με αναρρόφηση μεταφέρθηκαν σε μεμονωμένους κλωβούς ενηλίκων που κατασκευάστηκαν από ένα διαφανές πλαστικό κύπελλο χωρητικότητας 400 mL που τοποθετήθηκε ανεστραμένο και στερεώθηκε στο καπάκι ενός τρυβλίου Petri διαμέτρου 9 cm. Ένα πλαϊνό παράθυρο (3 cm x 5 cm) χρησίμευε για αερισμό, ενώ μια μικρή οπή στο πάνω μέρος του κλωβού παρείχε την είσοδο στο κλουβί. Τροφή στα ενήλικα (διάλυμα ζάχαρης 5%) παρέχόταν από ένα βαμβακερό φυτίλι που περνούσε από τη βάση του κλωβού στην κάτω βάση του τρυβλίου Petri. Οι θάνατοι καταγραφόταν καθημερινά μέχρι το θάνατο του τελευταίου ατόμου. Η μεταχείριση επαναλήφθηκε καθώς σκοπός ήταν να συγκεντρωθούν 50 άτομα από κάθε φύλο και βιότυπο. Στη μεταχείριση με τα παρθένα άτομα,

ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία αλλά στα διαφανή κλουβιά τοποθετήθηκαν 80 νύμφες από το ίδιο φύλο ώστε ο συνωστισμός να είναι ο ίδιος.

6.4 Στατιστική ανάλυση

Η επίδραση της σύζευξης, του φύλου και η αλληλεπίδραση αυτών στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων ελέγχθηκε με το πρότυπο ανάλογων κινδύνων Cox (Cox proportional hazards model). Η σύγκριση της μακροβιότητας παρθένων και συζευγμένων αρσενικών και θηλυκών πραγματοποιήθηκε κατά ζεύγη με τον έλεγχο Log - rank (Mantel-Cox). Οι πίνακες ζωής και τα γραφήματα δημιουργήθηκαν με το Microsoft Excel. Για όλες τις αναλύσεις το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο $\alpha = 0,05$. Η ανάλυση των δεδομένων καθώς και η σχεδίαση των γραφημάτων έγινε με το IBM SPSS 25.00 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

6.5 Αποτελέσματα

Η μέση διάρκεια ζωής των ενηλίκων του *Culex pipiens* f. *pipiens* ανεξάρτητα από το φύλο και το ιστορικό σύζευξης κυμάνθηκε περίπου από 64 - 93 ημέρες (Πίνακας 6.1). Για κάθε μεταχείριση σύζευξης χρησιμοποιήθηκαν για τα αρσενικά 43 παρθένα και 48 συζευγμένα άτομα ενώ για τα θηλυκά 50 παρθένα και 47 συζευγμένα. Η επιβίωση στα παρθένα και συζευγμένα αρσενικά κυμάνθηκε από έφρασε τις 27 - 137 και 64 - 134 ημέρες, ενώ στα θηλυκά από 29 - 93 και 39 - 107 ημέρες αντίστοιχα.

Το μοντέλο ανάλογων κινδύνων του Cox έδειξε ότι το φύλο είχε σημαντική επίδραση στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων ενώ η σύζευξη και η αλληλεπίδραση του φύλου και της σύζευξης δεν είχαν σημαντική επίδραση στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων (Πίνακας 6.2).

Πίνακας 6.1 Επίδραση της σύζευξης στη διάρκεια ζωής αρσενικών και θηλυκών του *Culex pipiens f. pipiens*.

Κατηγορία ενηλίκων	Διάρκεια ζωής (ημέρες ± SE)			
	Μέσος όρος	Τεταρτημόρια		
		25	50	75
Αρσενικά				
Παρθένα (n=43)	82,4 ± 3,5 ^α	93,0 ± 5,5	83,0 ± 2,6	71,0 ± 5,7
Συζευγμένα (n=48)	93,7 ± 2,5 ^α	108,0 ± 4,3	92,0 ± 4,0	79,0 ± 2,6
Θηλυκά				
Παρθένα (n=50)	64,4 ± 2,3 ^β	77,0 ± 4,8	65,0 ± 1,8	53,0 ± 3,6
Συζευγμένα (n=47)	65,6 ± 2,0 ^β	73,0 ± 4,1	65,0 ± 2,2	58,0 ± 1,0

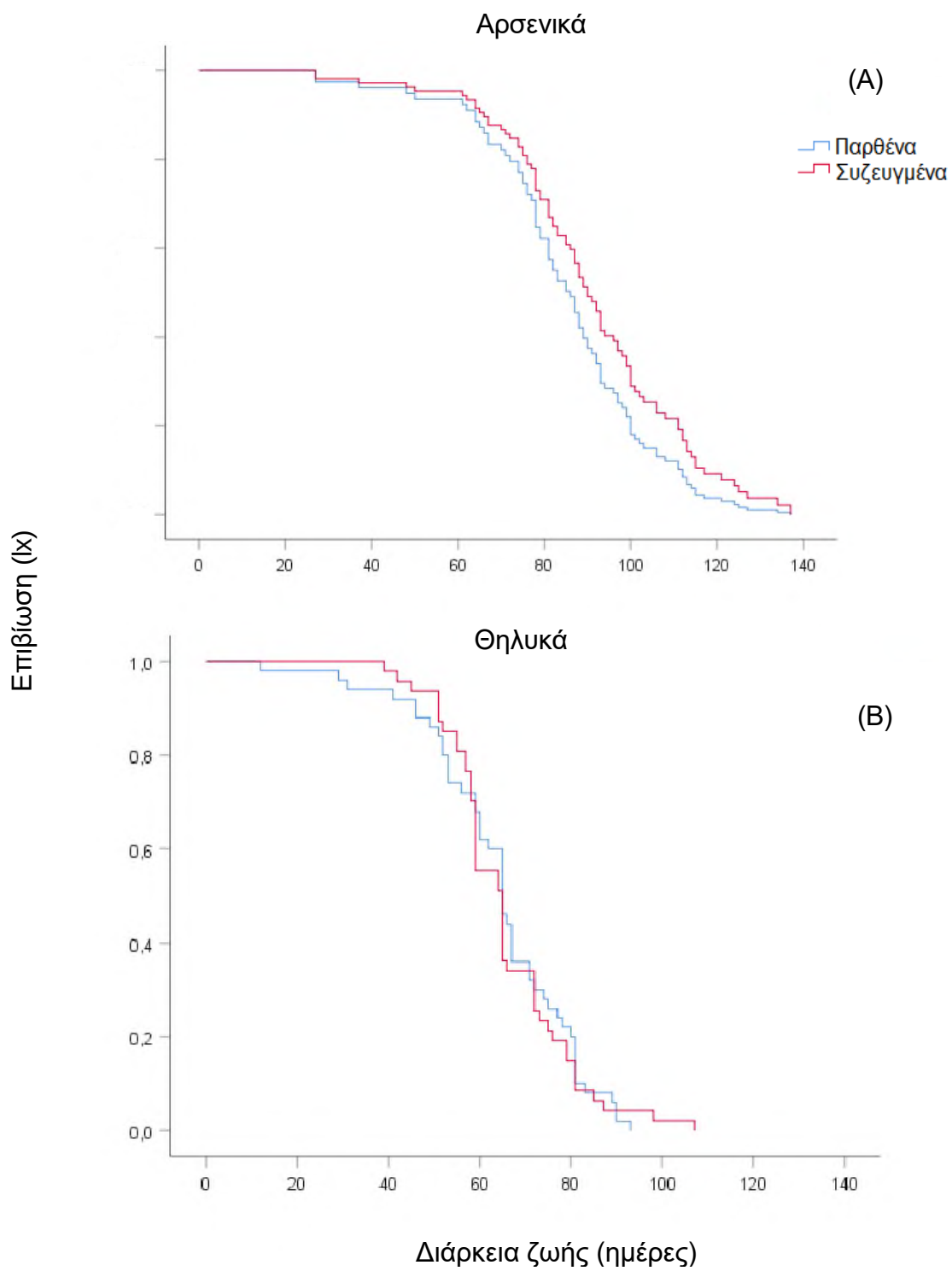
Τιμές εντός της ίδιας στήλης και του ίδιου φύλου που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν σημαντικά (p) > 0,05

Πίνακας 6.2 Μεταβλητές του μοντέλου ανάλογων κινδύνων του Cox για την μακροβιότητα ενηλίκων για την επίδραση του φύλου και της σύζευξης του *Culex pipiens f. pipiens*

Πηγή παραλλακτικότητας	$\beta \pm SE$	Exp(B)	p
Φύλο	-1,548 $\pm$ 0,224	0,213	<0,001
Σύζευξη	-0,019 $\pm$ 0,204	0,982	0,982
Φύλο x Σύζευξη	0,330 $\pm$ 0,294	1,391	0,262

Στο Διάγραμμα 6.1 απεικονίζεται η επιβίωση των ενηλίκων αρσενικών και θηλυκών σε σχέση με τη σύζευξη. Στα αρσενικά η επιβίωση ήταν ελαφρώς υψηλότερη στα συζευγμένα σε σχέση με τα παρθένα. Στα θηλυκά δεν παρατηρήθηκε καμία διαφοροποίηση στην επιβίωση μεταξύ συζευγμένων και παρθένων. Η θνησιμότητα στα αρσενικά ως την ηλικία των 63 ημερών ήταν αρκετά χαμηλή (<10%). Από την ηλικία των 65 περίπου ημερών παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της θνησιμότητας με αποτέλεσμα το 50% των αρσενικών να πεθάνουν ως την ηλικία των 90 ημερών. Το 80% των αρσενικών είχαν πεθάνει έως και την ηλικία των 97 ημερών. Για τα θηλυκά η θνησιμότητα ως την ηλικία

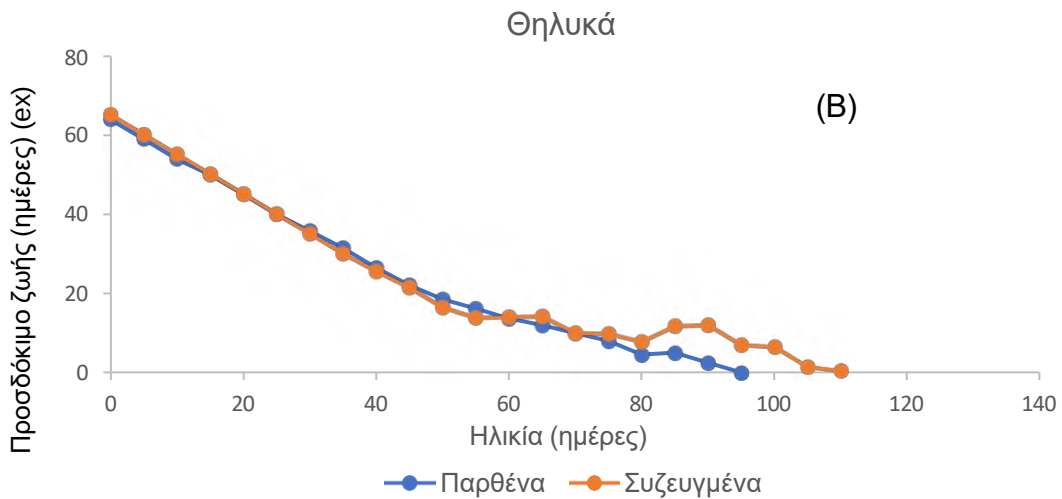
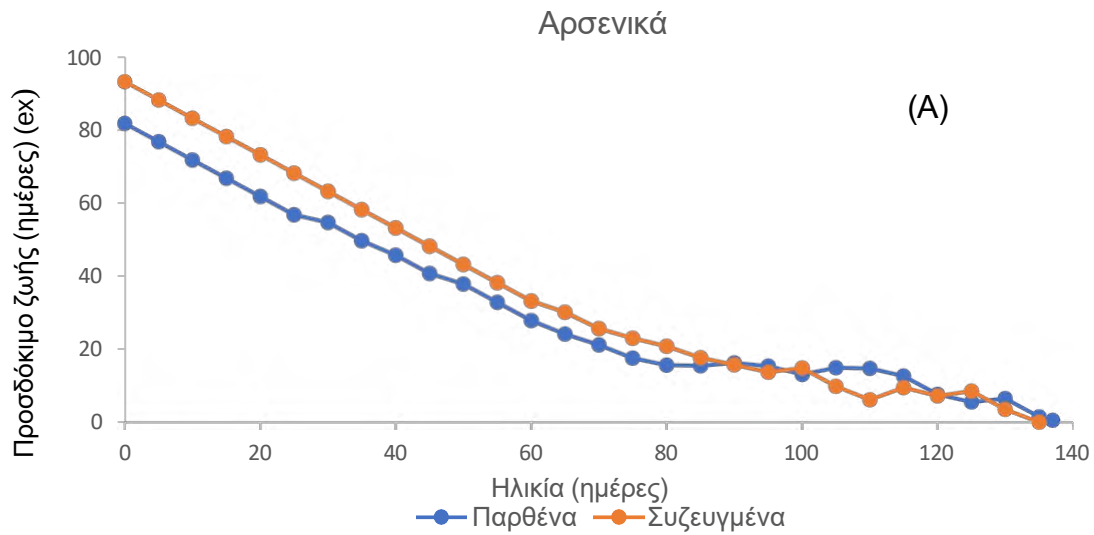
των 50 ημερών ήταν χαμηλή (<10%). Από την ηλικία των 55 περίπου ημερών παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της θνησιμότητας με αποτέλεσμα το 50% των θηλυκών να πεθάνουν ως την ηλικία των 63 ημερών. Το 80% θηλυκών έχουν πεθάνει έως και την ηλικία 85 περίπου ημερών.



Διάγραμμα 6.1 Αθροιστικές καμπύλες επιβίωσης (lx) παρθένων και συζευγμένων αρσενικών (Α) και θηλυκών (Β) του *Cx. pipiens* f. *pipiens* σε σχέση με την ηλικία.

Στο Διάγραμμα 6.2 απεικονίζεται το προσδόκιμο ζωής για παρθένα και συζευγμένα ενήλικα αρσενικά και θηλυκά του *Cx. pipiens* f. *pipiens*. Το προσδόκιμο ζωής για τα αρσενικά κατά την έξοδό τους από το νυμφικό περίβλημα ήταν υψηλότερο στα συζευγμένα σε σχέση με τα παρθένα ενήλικα. Το προσδόκιμο ζωής ήταν παραπλήσιο μετά την 80^η ημέρα της ενήλικης ζωής τους. Οι δύο καμπύλες ταυτίζονται έως την 90^η ημέρα ενώ στη συνέχεια παρατηρείται απόκλιση αυτών με τα συζευγμένα να παρουσιάζουν εμφανή περεταίρω αύξηση του προσδόκιμου ζωής. Οι δύο καμπύλες ταυτίζονται εκ νέου μετά την 120^η ημέρα και ακολουθούν πτωτική πορεία μέχρι και τον θάνατο του τελευταίου ενήλικου ατόμου στις 137 και 134 ημέρες αντίστοιχα.

Στα θηλυκά το προσδόκιμο ζωής βαίνει μειούμενο στα συζευγμένα και ανεξάρτητα της σύζευξης ταυτίζεται με εκείνο των παρθένων. Το προσδόκιμο ζωής τόσο στα παρθένα όσο και στα συζευγμένα ταυτίζεται έως και περίπου τις 70 ημέρες οπότε και μειώνεται στις 10 ημέρες. Έκτοτε, στα συζευγμένα παρατηρείται μία παροδική αύξηση του προσδόκιμου ζωής έως και την 90^η ημέρα στην οποία έχουν επιζήσει 2 θηλυκά και μειώνεται εκ νέου μέχρι και τον θάνατο του τελευταίου στις 107 ημέρες. Αντίθετα, τα παρθένα ακόμη και μετά την 70^η ημέρα διατηρούν τη μειούμενη πορεία του προσδόκιμου ζωής έως και το θάνατο του τελευταίου ενήλικου ατόμου την 93^η ημέρα (Βλ. Παράρτημα V).



Διάγραμμα 6.2 Σχέση του προσδόκιμου ζωής με την ηλικία (ημέρες) παρθένων και συζευγμένων αρσενικών (A) και θηλυκών (B) του *Cx. pipiens* f. *pipiens*.

Η μέση διάρκεια ζωής των ενηλίκων του *Cx. pipiens f. molestus* ανεξάρτητα από το φύλο και το ιστορικό σύζευξης κυμάνθηκε από περίπου 45 – 56 ημέρες (Πίνακας 6.3). Για κάθε μεταχείριση σύζευξης χρησιμοποιήθηκαν 50 άτομα για κάθε φύλο. Η επιβίωση στα παρθένα και συζευγμένα αρσενικά έφτασε τις 23 – 81 και 25 – 70 ημέρες, ενώ για τα αντίστοιχα θηλυκά έφτασε τις 19 – 71 και 25 – 70 ημέρες αντίστοιχα.

Πίνακας 6.3 Επίδραση της σύζευξης στη διάρκεια ζωής αρσενικών και θηλυκών του *Culex pipiens f. molestus*

Κατηγορία ενηλίκου	Διάρκεια ζωής (ημέρες ± SE)			
	Μέσος όρος	Τεταρτημόρια		
		25	50	75
Αρσενικά				
Παρθένα (n=50)	56,3 ± 1,7 ^α	64,0 ± 1,9	57,0 ± 1,8	52,0 ± 2,1
Συζευγμένα (n=50)	37,7 ± 1,4 ^β	44,0 ± 1,8	36,0 ± 1,5	30,0 ± 1,4
Θηλυκά				
Παρθένα (n=50)	51,2 ± 1,5 ^α	56,0 ± 1,2	52,0 ± 1,8	47,0 ± 2,1
Συζευγμένα (n=50)	45,2 ± 1,4 ^β	52,0 ± 2,5	45,0 ± 1,8	39,0 ± 2,1

Τιμές εντός της ίδιας στήλης και του ίδιου φύλου που δε συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα διαφέρουν σημαντικά (pairwise comparisons, log rank, $p < 0,05$)

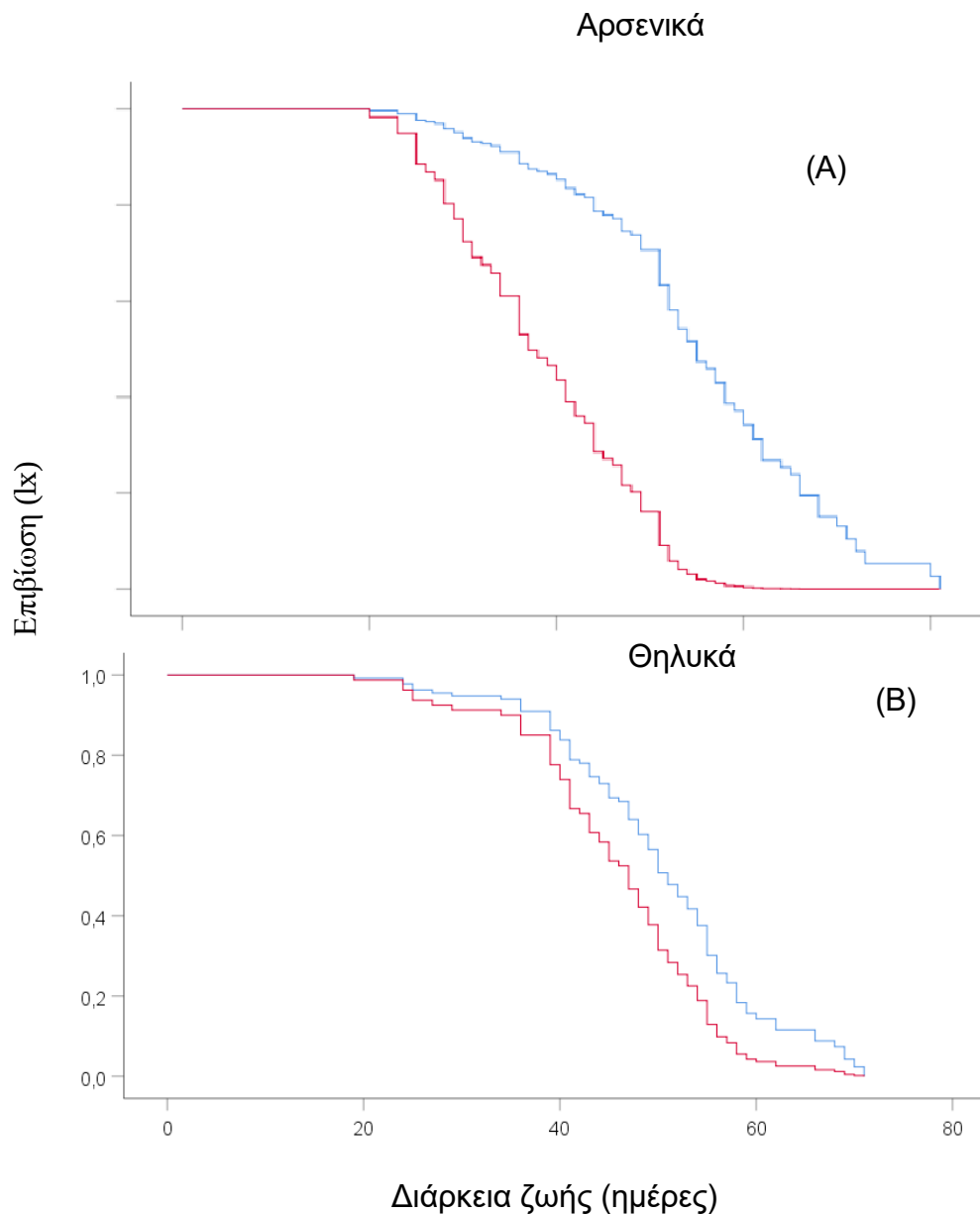
Το μοντέλο ανάλογων κινδύνων του Cox έδειξε ότι το φύλο και η αλληλεπίδραση του φύλου και της σύζευξης είχε σημαντική επίδραση στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων ($p < 0,001$) και η σύζευξη είχε σημαντική επίδραση στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων ($p = 0,012$) (Πίνακας 6.4). Αναφορικά με τις συγκρίσεις ανά ζεύγη όλα τα ζεύγη των ομάδων διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (αρσενικά παρθένα - συζευγμένα, $\chi^2=57,148$, $p<0,001$, θηλυκά παρθένα – συζευγμένα $\chi^2= 7,645$, $p=0,006$)

Πίνακας 6.4 Μεταβλητές του μοντέλου ανάλογων κινδύνων του Cox για επιβίωση παρθένων και συζευγμένων αρσενικών και θηλυκών του *Culex pipiens f. molestus*

Πηγή παραλλακτικότητας	$\beta \pm SE$	Exp(B)	p
Φύλο	0,728 $\pm$ 0,204	2,072	<0,001
Σύζευξη	-0,507 $\pm$ 0,202	0,602	0,012
Φύλο x Σύζευξη	-1,220 $\pm$ 0,291	0,295	<0,001

β εκτιμώμενοι συντελεστές στο μοντέλο παλινδρόμησης ανάλογων κινδύνων του Cox

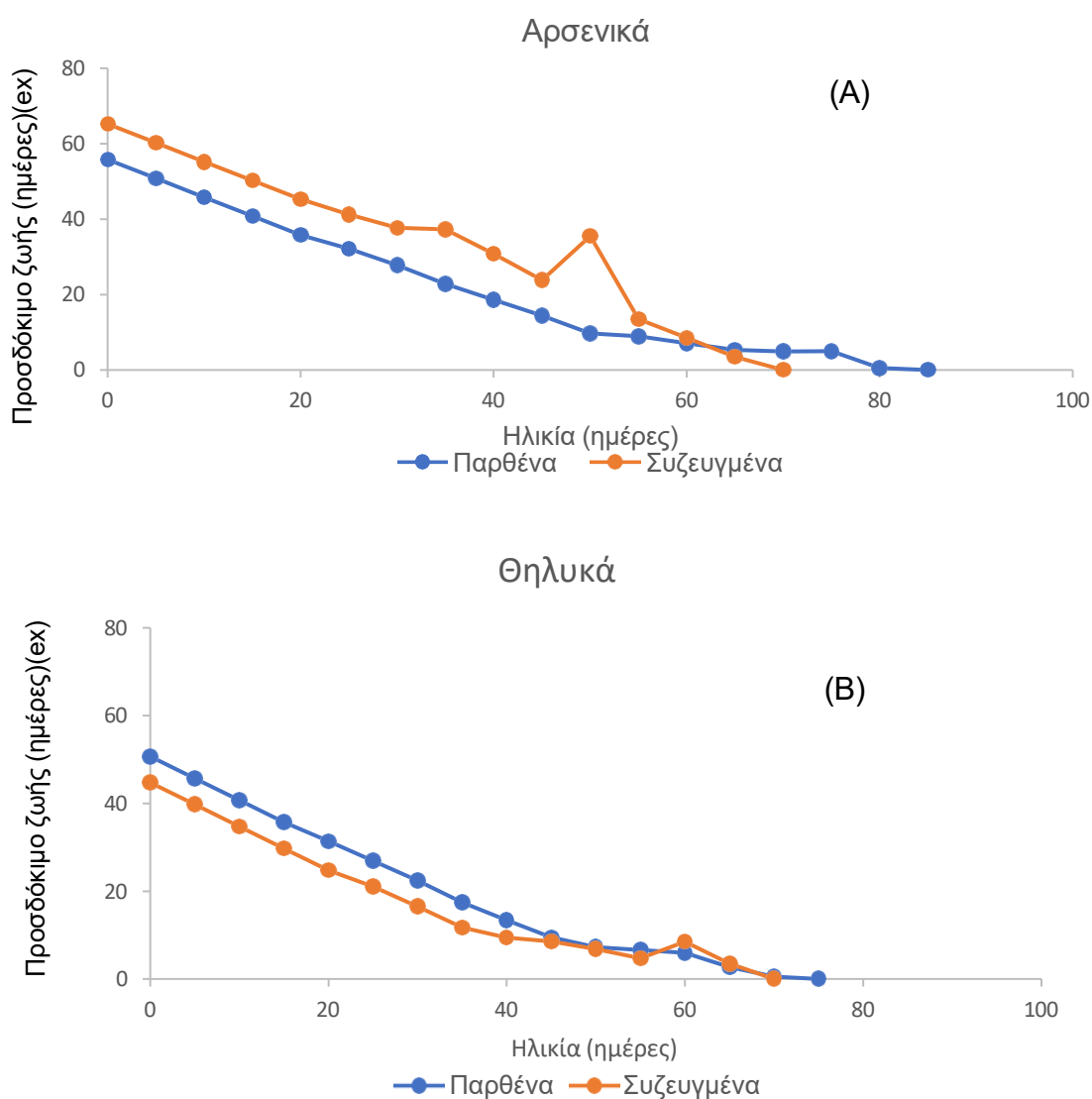
Στο Διάγραμμα 6.3 απεικονίζεται η επιβίωση των ενηλίκων αρσενικών και θηλυκών σε σχέση με τη σύζευξη. Στα αρσενικά η σύζευξη μείωσε την διάρκεια ζωής τους, γεγονός που συνέβη και στα θηλυκά. Η πορεία της αθροιστικής επιβίωσης των ενηλίκων αρσενικών και θηλυκών ήταν σχεδόν παράλληλη και στα συζευγμένα και στα παρθένα άτομα, αν και η διάρκεια ζωής των αρσενικών ήταν μακρύτερη. Η θνησιμότητα στα συζευγμένα και παρθένα αρσενικά σε επίπεδα <10% βρίσκεται στην ηλικία των 25 και 40 ημερών αντίστοιχα ενώ για τα αντίστοιχα θηλυκά είναι στις 40 ημέρες. Το 50% των συζευγμένων αρσενικών έχει πεθάνει έως την ηλικία των 40 ημερών ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στα παρθένα φτάνει τις 60 ημέρες, ενώ στα θηλυκά τις 50 ημέρες. Το δε 80% των συζευγμένων αρσενικών έχει πεθάνει μέχρι τις 50 ημέρες, στα παρθένα το ίδιο ποσοστό φτάνει τις 70 ημέρες, ενώ στα θηλυκά τις 60 ημέρες αντίστοιχα.



Διάγραμμα 6.3. Αθροιστικές καμπύλες επιβίωσης (lx) παρθένων και συζευγμένων αρσενικών (Α) και θηλυκών (Β) του *Cx. pipiens f. molestus* σε σχέση με την ηλικία.

Στο Διάγραμμα 6.4 απεικονίζεται το προσδόκιμο ζωής για παρθένα και συζευγμένα ενήλικα αρσενικά και θηλυκά του *Cx. pipiens f. molestus*. Στα αρσενικά το προσδόκιμο ζωής ήταν υψηλότερο στα συζευγμένα από τα παρθένα και βαίνει μειούμενο εκτός από μία στιγμιαία αύξηση, παράλληλα με εκείνο των παρθένων. Οι δύο καμπύλες ταυτίζονται περίπου την 55^η ημέρα και ακολουθούν πτωτική πορεία με εκείνη των συζευγμένων να είναι αμεσότερη καθώς ο θάνατος του τελευταίου ενήλικου ατόμου είναι στις 70 ημέρες ενώ στα παρθένα στις 81 ημέρες.

Στα θηλυκά το προσδόκιμο ζωής ήταν υψηλότερο στα συζευγμένα από τα παρθένα και βαίνει μειούμενο, παράλληλα με εκείνο των παρθένων. Οι δύο καμπύλες είναι παράλληλες μέχρι περίπου την 45^η ημέρα ενώ στη συνέχεια παρατηρείται απόκλιση αυτών με τα συζευγμένα να παρουσιάζουν εμφανή περεταίρω αύξηση του προσδόκιμου ζωής. Οι δύο καμπύλες ταυτίζονται περίπου την 45^η ημέρα και ακολουθούν πτωτική πορεία μέχρι και τον θάνατο του τελευταίου στις 71 και 70 ημέρες αντίστοιχα (Βλ. Παράρτημα V).



Διάγραμμα 6.4 Σχέση του προσδόκιμου ζωής με την ηλικία (ημέρες) παρθένων και συζευγμένων αρσενικών και θηλυκών του *Cx. pipiens f. molestus*.

Το μοντέλο ανάλογων κινδύνων του Cox όταν συμπεριλήφθηκαν και οι δύο βιότυποι έδειξε πως ο βιότυπος, το φύλο, η σύζευξη καθώς και η αλληλεπίδραση της σύζευξης και του φύλου, του βιότυπου και του φύλου, του

βιότυπου και της σύζευξης καθώς και του βιότυπου, της σύζευξης και του φύλου είχαν σημαντική επίδραση ($p < 0,01$) στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων (Πίνακας 6.5).

Πίνακας 6.5 Μεταβλητές του μοντέλου ανάλογων κινδύνων του Cox για επιβίωση ενηλίκων αρσενικών και θηλυκών παρθένων και συζευγμένων του *Culex pipiens* f. *pipiens* και του *Culex pipiens* f. *molestus*.

Πηγή παραλλακτικότητας	$\beta \pm SE$	$\text{Exp}(\beta)$	p
Βιότυπος	$-1,809 \pm 0,220$	0,164	$<0,001$
Σύζευξη	$-0,515 \pm 0,201$	0,597	$<0,010$
Φύλο	$0,716 \pm 0,203$	2,046	$<0,001$
Σύζευξη x Φύλο	$-1,236 \pm 0,288$	0,290	$<0,001$
Βιότυπος x Φύλο	$-2,252 \pm 0,302$	0,105	$<0,001$
Βιότυπος x Σύζευξη	$0,514 \pm 0,287$	1,672	0,073
Βιότυπος x Σύζευξη x Φύλο	$1,550 \pm 0,412$	4,711	$<0,001$

β εκτιμώμενοι συντελεστές στο μοντέλο παλινδρόμησης ανάλογων κινδύνων του Cox

6.6 Συζήτηση

Τα αρσενικά του *Cx. pipiens* f. *pipiens* είχαν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής ανεξάρτητα αν συζεύχθηκαν ή όχι σε σχέση με τα θηλυκά καθώς και μεγαλύτερο προσδόκιμο ζωής. Στο *Cx. pipiens* f. *molestus* μεγαλύτερη διάρκεια ζωής είχαν τα παρθένα άτομα και των δύο φύλων. Συγκεκριμένα, α) η σύζευξη επηρεάζει τη μακροβιότητα του βιότυπου *Cx. pipiens* f. *molestus* αλλά όχι εκείνου του *Cx. pipiens* f. *pipiens*. Στο *Cx. pipiens* f. *pipiens* η διάρκεια ζωής των παρθένων αρσενικών ήταν περίπου 20 ημέρες μεγαλύτερη από τα αντίστοιχα θηλυκά ενώ στα συζευγμένα αρσενικά η διάρκεια ζωής ήταν περίπου ένα μήνα μεγαλύτερη σε σχέση με τα αντίστοιχα θηλυκά. Τα συζευγμένα αρσενικά και θηλυκά του *Cx. pipiens* f. *molestus* είχαν μικρότερη διάρκεια ζωής από τα παρθένα. Στο *Cx. pipiens* f. *molestus* η σύζευξη στα αρσενικά μείωσε την διάρκεια ζωής περίπου 20 ημέρες ενώ και στα θηλυκά η σύζευξη μείωσε την διάρκεια ζωής αλλά σε μικρότερο βαθμό. Η μακροβιότητα (β) ήταν μικρότερη τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά του *Cx. pipiens* f. *pipiens* σε σχέση με το *Cx. pipiens* f. *molestus*, ενώ γ) γ) η σύζευξη είχε διαφορετική επίδραση στα θηλυκά σε σχέση με τα

αρσενικά.

Στην παρούσα έρευνα, η σύζευξη και κατ' επέκταση η μεταφορά σπέρματος και των συνοδών εκκριμάτων από το αρσενικό στο θηλυκό δεν επηρέασε τη μακροβιότητα των ενηλίκων αρσενικών και θηλυκών του *Cx. pipiens* f. *pipiens*. Η αύξηση της μακροβιότητας των θηλυκών λόγω της μεταφοράς σπέρματος και προϊόντων των αρσενικών βοηθητικών αδένων, όπως πρωτεϊνών σπερματικού υγρού (SFPs) έχει καταγραφεί για το *Ae. aegypti* από τους Helinski & Harrington (2011).

Επιπλέον, οι Andeadis και συν. (2014) μελέτησαν τη διάρκεια ζωής παρθένων αρσενικών και θηλυκών του *Culex pipiens* f. *pipiens* σε εύρος θερμοκρασιών. Στα αρσενικά η διάρκεια ζωής ήταν αρκετά μικρότερη και διέφερε σημαντικά με την παρούσα έρευνα, ενώ στα θηλυκά ήταν μικρότερη αλλά υψηλότερη από τα αρσενικά και διαφέρει σημαντικά με την παρούσα έρευνα. Αυτές οι διαφορές πιθανώς οφείλονται στη διαφορετική μεταχείριση των κουνουπιών στο προνυμφικό στάδιο (συνωστισμός προνυμφών, θερμοκρασία, ποσότητα τροφής). Επίσης, σε έρευνα του Abouzied (2017) σε προσομοίωση της περιόδου χειμώνας – άνοιξη η διάρκεια ζωής των αρσενικών διέφερε σημαντικά σε σχέση με την παρούσα έρευνα ενώ στα θηλυκά δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές.

Στο *Cx. pipiens* f. *molestus* η σύζευξη μείωσε την διάρκεια ζωής των συζευγμένων αρσενικών και θηλυκών. Επιπλέον, τόσο το φύλο όσο και η αλληλεπίδραση φύλου και σύζευξης επιδρούν σημαντικά στη μακροβιότητα του *Cx. pipiens* f. *molestus*. Συνεπώς ο βιότυπος *Cx. pipiens* f. *molestus* αντιδρά διαφορετικά στη σύζευξη σε σχέση με τον *Cx. pipiens* f. *pipiens* γεγονός που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Σε αντίστοιχη έρευνα των Spanoudis και συν. (2018) για το *Cx. pipiens* f. *molestus* η μακροβιότητα αρσενικών και θηλυκών διέφερε σημαντικά (μειώθηκε) με τα ευρήματα της παρούσας έρευνας τόσο στα συζευγμένα αρσενικά και στα θηλυκά. Επίσης, σε έρευνα των Gao και συν. (2019) η διάρκεια ζωής των παρθένων αρσενικών του *Cx. pipiens* f. *molestus* ήταν η μισή σε σχέση με την παρούσα έρευνα, ενώ και στα θηλυκά ήταν μικρότερη αλλά με μικρή διαφορά. Οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των

διαφορετικών μελετών πιθανώς να οφείλονται στις διαφορές της πειραματικής διαδικασίας καθώς και στη γενετική παραλλακτικότητα των πληθυσμών καθώς προέρχονται από διαφορετικές περιοχές.

Σε κάθε περίπτωση, υπάρχει σημαντική διαφορά στη μακροβιότητα μεταξύ του *Cx. pipiens* f. *pipiens* και του *Cx. pipiens* f. *molestus* όπως άλλωστε διαπιστώθηκε και από τους Ιοαννου και συν. (2021). Το συγκεκριμένο εύρημα εν μέρει μπορεί να οφείλεται στη διαφορετική καταγωγή των δύο βιοτύπων και στην ατελή προσαρμογή του *Cx. pipiens* f. *molestus* στις συνθήκες που επικρατούν επάνω από το έδαφος.

Σχετικά με το προσδόκιμο ζωής στον βιότυπο *Cx. pipiens* f. *pipiens* ήταν υψηλότερο σε σχέση με το *Cx. pipiens* f. *molestus* τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά (συζευγμένα, ασύζευκτα). Αυτό πρακτικά σημαίνει πως η παρατεταμένη διάρκεια ζωής των κουνουπιών του γένους *Culex* «μετατρέπεται» τα ενήλικα θηλυκά σε αποθήκες διαχείμασης και μετάδοσης του ιού (Nelms et al., 2013). Το εύρημα αυτό αποκτά ιδιαίτερη σημασία λόγω της κλιματικής αλλαγής, με τη θερμοκρασία να βρίσκεται κοντά στους 25 °C μέχρι και τις αρχές Οκτώβρη στη χώρα μας. Οι δύο βιότυποι έχουν συνεργιστική δράση καθώς ο *Cx. pipiens* f. *pipiens* προάγει τη μετάδοση του ιού μεταξύ των πτηνών και τον δε *Cx. pipiens* f. *molestus* τη μεταφορά του στους ανθρώπους. Συνεπώς, γίνεται εμφανής ο λόγος που παρατηρήθηκαν περιστατικά του ΙΔΝ Στην Ελλάδα ακόμη και κατά τη φθινοπωρινή περίοδο. Τα επόμενα έτη οι ευνοϊκές θερμοκρασίες πιθανώς να ενισχύσουν την περιφερειακή κυκλοφορία του ΙΔΝ και σε συνάρτηση με τους ήπιους χειμώνες πιθανώς ευοδώσουν τη μετάδοση του ιού για περισσότερο χρονικό διάστημα κατά την διάρκεια του έτους.

Η μακροβιότητα όσο και το προσδόκιμο ζωής των κουνουπιών διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των προγραμμάτων καταπολέμησής τους. Στην εκπόνηση των στρατηγικών καταπολέμησης μεγάλη σημασία έχουν οι πίνακες επιβίωσης και ο ρυθμός μείωσης του προσδόκιμου ζωής για το κάθε είδος κουνουπιού. Πιο συγκεκριμένα, στο *Cx. pipiens* f. *pipiens* ο ρυθμός μείωσης του προσδόκιμου ζωής είναι μεγαλύτερος σε σχέση με το *Cx. pipiens* f. *molestus* από το 25% στο 50% της επιβίωσης. Επιπλέον, τα αρσενικά του *Cx. pipiens* f. *pipiens* τόσο στο 25% όσο και στο

50% της επιβίωσης έχουν μεγαλύτερο προσδόκιμο ζωής από τα θηλυκά ενώ στο *Cx. pipiens* f. *molestus* το προσδόκιμο ζωής είναι μικρότερο σε σχέση με το *Cx. pipiens* f. *pipiens* εκτός από τα συζευγμένα αρσενικά, όπου το υψηλό προσδόκιμο ζωής οφείλεται στο μικρό αριθμό ενηλίκων. Το μικρότερο προσδόκιμο ζωής μπορεί να σχετίζεται με την καταγωγή του κάθε βιοτύπου (υπόγεια ή υπέργεια) και τον βαθμό προσαρμογής τους στις επικρατούσες κλιματολογικές συνθήκες.

Τα συγκεκριμένα δεδομένα υποδεικνύουν στρατηγική καταπολέμησης με βάση το πλήθος των ζώντων ενηλίκων κουνουπιών ώστε αυτή να είναι κατά το δυνατόν αποτελεσματική με το μικρότερο δυνατό οικονομικό και επιδημιολογικό κυρίως κόστος. Με δεδομένο ότι η χρονική περίοδος των 70 - 80 ημερών καλύπτει τη θερινή και τουριστική περίοδο τα προγράμματα καταπολέμησης πρέπει να αρχίζουν έγκαιρα και να επαναλαμβάνονται ανάλογα και με το γεωγραφικό πλάτος καθώς σε περιοχές όπως το νότιο Αιγαίο και η Κρήτη, οι θερμοκρασίες παραμένουν υψηλές για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα. Μέχρι σήμερα τα προγράμματα καταπολέμησης πραγματοποιούνται εμπειρικά, ενώ τα δεδομένα της παρούσας έρευνας επιτρέπουν πτην προσέγγιση σε τεκμηριωμένο και ακριβή σχεδιασμό.

Τα ευρήματά μας είναι ενδεικτικά για τις παραμέτρους που πρέπει να λαμβάνουν υπόψη οι φορείς της δημόσιας υγείας για τον έλεγχο των ασθενειών που μεταφέρουν τα κουνούπια. Προτείνεται ο σχεδιασμός και η εκτέλεση πειραμάτων υπαίθρου προκειμένου να επιβεβαιωθούν, να συγκριθούν και να ενοποιηθούν τα αποτελέσματα από το εργαστήριο και το πεδίο. Τα πειράματα πεδίου θα έδιναν στοιχεία για τη βιολογία των ενηλίκων κουνουπιών σε όλη την ελληνική επικράτεια με μεταβλητές τη θερμοκρασία, την υγρασία, την επάρκεια τροφής, τον αριθμό των συζεύξεων των θηλυκών, την πυκνότητα – αναλογία αρσενικών και θηλυκών κουνουπιών και τον ανταγωνισμός σύζευξης. Οι επικεφαλής της δημόσιας υγείας και γενικότερα οι υπεύθυνοι χάραξης πολιτικής μπορούν να ενισχύσουν τις υποδομές που υποστηρίζουν μακροπρόθεσμες πρακτικές για την καταπολέμηση των κουνουπιών σε τοπικό και εθνικό επίπεδο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

7 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΓΕΥΜΑΤΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ ΣΤΑ ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ *CULEX PIRIENS* F. *PIRIENS* ΚΑΙ *CULEX PIRIENS* F. *MOLESTUS*

7.1 Περίληψη

Το *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) και οι δύο βιότυποί του βρίσκονται τόσο στο υπόγειο όσο και στα υπέργεια περιβάλλοντα της Θεσσαλίας. Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των δύο βιοτύπων του (*Culex pipiens* f. *pipiens* και *Culex pipiens* f. *molestus*) δεν έχουν μελετηθεί συγκρητικά. Μελετήθηκε η επίδραση του γεύματος αίματος στη μακροβιότητα των ενηλίκων θηλυκών. Επίσης, εκτός της μακροβιότητας μελετήθηκαν και άλλα δημογραφικά χαρακτηριστικά όπως η ωοπαραγωγή, ο αριθμός των νυμφών που παρήχθησαν, το ποσοστό νύμφωσης, ο αριθμός των ενηλίκων απογόνων, ο αριθμός αρσενικών και θηλυκών απογόνων, η αναλογία αρσενικών και θηλυκών απογόνων. Χρησιμοποιήθηκαν ενδημικοί πληθυσμοί κουνουπιών της Θεσσαλίας (Λάρισα, Βόλος) και τα πειράματα διεξήχθησαν σε ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες [(θερμοκρασία (25°C), υγρασία (65 ± 5% RH), φωτοπερίοδος (14:10 L:D)]. Στο *Cx. pipiens* f. *pipiens* το γεύμα αίματος είχε σημαντική επίδραση στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων σε αντίθεση με το *Cx. pipiens* f. *molestus*. Το γεύμα αίματος είχε σημαντική επίδραση στις δημογραφικές παραμέτρους αναπαραγωγής του *Cx. pipiens* f. *pipiens* του οποίου οι τιμές ήταν υψηλότερες σε σχέση με το *Cx. pipiens* f. *molestus* εκτός από την αναλογία αρσενικών και θηλυκών απογόνων. Στο *Cx. pipiens* f. *pipiens* το γεύμα αίματος μείωσε τη μακροβιότητα, όχι όμως και στο *Cx. pipiens* f. *molestus*. Συνεπώς, γίνεται εμφανές πως το γεύμα αίματος επηρεάζει τη διάρκεια ζωής και τα χαρακτηριστικά της αναπαραγωγής των βιοτύπων του *Cx. pipiens*, γεγονός που πιθανώς συνδέεται με τη μετάδοση ασθενειών και τις στρατηγικές καταπολέμησής τους.

7.2 Εισαγωγή

Τα κουνούπια είναι υπεύθυνα για τη μετάδοση παθογόνων που προκαλούν ασθένειες στον άνθρωπο, όπως ο ιός Zika, ο ιός του κίτρινου πυρετού, ο ιός chikungunya, ο ιός του δάγκειου πυρετού και ο ιός του Δυτικού Νείλου, καθώς και για τους νηματώδεις σκώληκες που προκαλούν φιλαρίαση και παράσιτα του γένους *Plasmodium* που προκαλούν ελονοσία (Franklinos, 2019) (βλέπε Κεφάλαιο 1). Άμεσο επακόλουθο αυτών των ασθενειών είναι οι χρόνιες παθήσεις αλλά κυρίως οι θάνατοι, κατατάσσοντας το κουνούπι ως το πιο θανατηφόρο ζώο σε σύγκριση με καρχαρίες, λιοντάρια, φίδια και ανθρώπους (Chandrasegaran, 2020; Dijkstra, 2018). Συνεπώς, είναι αναγκαία η ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού προγράμματος καταπολέμησης κουνουπιών καθώς η ανθρώπινη ζωή είναι ανεκτίμητη.

Η έλλειψη αποτελεσματικών προγραμμάτων καταπολέμησης συνδέεται με την απουσία πρωτοκόλλων και μεθόδων που βασίζονται σε στοιχεία σχετικά με τη μακροβιότητα και με την ηλικιακή δομή των πληθυσμών (Cook et al., 2006; 2008; Styer et al., 2007), αν και η επιδημιολογική σημασία της ηλικίας του φορέα είναι γνωστή εδώ και σχεδόν 60 χρόνια (MacDonald, 1957). Είναι γνωστό ότι η μακροβιότητα των θηλυκών αυξάνει τη μετάδοση του παθογόνου που προκαλεί την εκάστοτε ασθένεια (James et al., 2013). Έρευνες σχετικά με τη διάρκεια ζωής και τα γεύματα αίματος των ενηλίκων θηλυκών κουνουπιών των βιοτύπων *Culex pipiens* f. *pipiens* και *Culex pipiens* f. *molestus* είναι σπάνιες, με τις περισσότερες εξ' αυτών να επικεντρώνονται στην προτίμηση του ξενιστή και στην ωοπαραγωγή. Τα θηλυκά κουνούπια για το σχηματισμό και για την ωρίμανση των ωών τους τρέφονται με γεύμα αίματος από σπονδυλωτά ζώα, όπως θηλαστικά, ερπετά, και αμφίβια ώστε να λάβουν τις απαραίτητες πρωτεΐνες και αμινοξέα (O'Meara, 2020; Roitberg and Gordon, 2005).

Το αναυτογενές θηλυκό *Culex pipiens* f. *pipiens* απαιτεί ένα γεύμα αίματος για την ανάπτυξη των ωών, και εάν δεν προκύψουν περιβαλλοντικές

διαταραχές, τα ωάρια σχηματίζονται με την ολοκλήρωση της πέψης του γεύματος αίματος (Clements, 1992). Αντίθετα, υπάρχουν αρκετά είδη κουνουπιών που δεν χρειάζονται γεύμα αίματος ώστε να αποθέσουν την πρώτη συστάδα ωών (Attardo et al., 2005). Η αυτογένεια (ωοτοκία χωρίς γεύμα αίματος) είναι υποχρεωτική ή προαιρετική ανάλογα με το είδος κουνουπιού και τις συνθήκες (Roubaud, 1929). Ειδικότερα, ο βιότυπος *Cx. pipiens* f. *molestus* αναπτύσσει την πρώτη συστάδα ωών αυτογενώς, αλλά για τις επόμενες χρειάζεται γεύμα αίματος (Dobrotworsky and Drummond, 1953; Dobrotworsky, 1954; Kassim et al., 2012a; Kassim et al., 2012b; Marshall, 1944). Τα γεύματα αίματος αυξάνουν το μέγεθος των σχεδίων με ωά (Wu et al., 2014). Επίσης, σημαντική επίδραση στην παραγωγή των ωών με αυτογένεια έχει η γεωγραφική απομόνωση των πληθυσμών καθώς και η διατροφή των προνυμφών και το μέγεθος των ενηλίκων (Clements, 1992; Kassim et al., 2012c,b; Lounibos et al., 1982). Πιο συγκεκριμένα, για το *Cx. pipiens* f. *molestus* έχει ερευνηθεί η ωοπαραγωγή, η αυτογένεια καθώς και άλλα δημογραφικά χαρακτηριστικά αλλά χωρίς γεύμα αίματος (Gao et al., 2019).

Αρκετές έρευνες διεξήχθησαν σχετικά με τη προτίμηση της διατροφής του *Cx. pipiens* (Al-Rashidi et al., 2022; Chikwendu et al., 2019; Shehata, 2018) με διαφορετικούς ξενιστές (γουρούνι, πουλί, κουνέλι και άνθρωπο) με σκοπό να αποσαφηνιστεί η σχέση των κουνουπιών στη μετάδοση μολυσματικών ιών. (Gomes et al., 2013; Muñoz et al., 2012; Osório et al., 2012) Από τα αποτελέσματα έγινε εμφανής η ορنيθοφιλική τάση του *Cx. pipiens* f. *pipiens* καθώς και η προτίμηση του *Cx. pipiens* f. *molestus* για τα θηλαστικά και για τον άνθρωπο (Huang et al., 2009; Kilpatrick et al., 2007).

Παρά το γεγονός πως οι δύο βιότυποι τρέφονται με αίμα από διαφορετικούς ή μερικώς επικαλυπτόμενους ξενιστές, έλκονται περισσότερο από τα πτηνά και συχνά τρέφονται με αίμα από διάφορα είδη πουλιών (Apperson et al., 2004; Gomes et al., 2013; Molaei et al., 2006; Rizzoli et al., 2015; Roiz et al., 2012; Vinogradova, 2000). Ο μηχανισμός με τον οποίο επιλέγουν τα πτηνά για γεύμα αίματος είναι ελάχιστα κατανοητός σε αντίθεση με τους χημικούς κώδικες που χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό και τη διάκριση των ανθρώπων από άλλους ξενιστές σπονδυλωτών (Bowen, 1991;

McBride et al., 2014; Omondiet. al., 2019; Takken and Knols, 1999; Takken and Verhulst, 2013; Zhao et al., 2020).

Από τις προαναφερθείσες έρευνες γίνεται εμφανές πως δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με τα γεύματα αίματος και την επίδρασή τους στα δημογραφικά χαρακτηριστικά των βιοτύπων του *Cx. pipiens*. Στο παρόν κεφάλαιο μελετήθηκε η επίδραση του γεύματος αίματος στη μακροβιότητα, στο προσδόκιμο ζωής και στα χαρακτηριστικά της ωοπαραγωγής του *Cx. pipiens f. pipiens* και του *Cx. pipiens f. molestus* σε σταθερές συνθήκες εκτροφής στο εργαστήριο. Τα αποτελέσματα αναμένονται να συμβάλουν στη δημιουργία μοντέλων πρόβλεψης της πληθυσμιακής δυναμικής των κουνουπιών που επηρεάζει και την πιθανότητα εμφάνισης και μετάδοσης ασθενειών.

7.3 Υλικά και μέθοδοι

7.3.1 Γενικά

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Π.Θ. από το φθινόπωρο έως το καλοκαίρι του 2019. Οι πειραματικές συνθήκες που επικρατούσαν περιγράφονται στην Ενότητα 2.1.

Χρησιμοποιήθηκαν πληθυσμοί των βιοτύπων *Cx. pipiens f. pipiens* και *Cx. pipiens f. molestus* από την περιοχή του Βόλου και της Λάρισας (Θεσσαλία). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στην F₂ – F₆ γενεά με ταυτόσημες εργαστηριακές συνθήκες. Η εκτροφή στα ανήλικα και ενήλικα στάδια πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην Ενότητα 2.2.

7.3.2 Επίδραση των γευμάτων αίματος στα δημογραφικά χαρακτηριστικά του *Cx. pipiens f. pipiens* και του *Cx. pipiens f. molestus*

Μελετήθηκε η διάρκεια ζωής των ενηλίκων και των δύο βιοτύπων με ένα και κανένα γεύμα αίματος. Για τη μελέτη των συζευγμένων θηλυκών ενηλίκων χωρίς γεύμα αίματος εισήχθησαν σε ένα κλωβό εκτροφής BugDorm-4F2222 Insect Rearing Cage 32,5 x 32,5 x 32,5 cm 40 αρσενικές και 40 θηλυκές νύμφες (σύνολο 80) οι οποίες τοποθετήθηκαν σε πλαστική λεκάνη διαμέτρου 7cm που

περιείχε 500ml νερού. Προστέθηκε διάλυμα ζάχαρης 10%w/v και τα ενήλικα παρέμειναν 6 ημέρες από την ενηλικίωσή τους με σκοπό την δυνατότητα σύζευξης. Την 7^η ημέρα (ως 1^η λαμβάνεται η ημέρα ενηλικίωσης της τελευταίας νύμφης) επιλέχθηκαν 25 ενήλικα θηλυκά άτομα με αναρρόφηση και μεταφέρθηκαν σε μεμονωμένους κλωβούς ενηλίκων που κατασκευάστηκαν από ένα διαφανές πλαστικό κύπελλο χωρητικότητας 400 mL που τοποθετήθηκε ανεστραμένο και στερεώθηκε στο καπάκι ενός τρυβλίου Petri διαμέτρου 9 cm. Ένα πλαϊνό παράθυρο (3 cm x 5 cm) χρησίμευε για αερισμό, ενώ μια μικρή οπή στο πάνω μέρος του κλωβού παρείχε την είσοδο στο κλουβί. Τροφή στα ενήλικα (διάλυμα ζάχαρης 5%) παρεχόταν από ένα βαμβακερό φυτίλι που περνούσε από τη βάση του κλωβού στην κάτω βάση του τρυβλίου Petri. Οι θάνατοι καταγραφόταν καθημερινά μέχρι το θάνατο του τελευταίου ατόμου. Η μεταχείριση επαναλήφθηκε καθώς σκοπός ήταν να δοκιμαστούν 50 θηλυκά άτομα από κάθε βιότυπο (Ενότητα 6.3.2).

7.3.3. Επίδραση του γεύματος αίματος στα δημογραφικά χαρακτηριστικά των θηλυκών

Culex pipiens f. pipiens

Ακολουθήθηκε η διαδικασία της σύζευξης (βλέπε παραπάνω) και την 7^η ημέρα της ενηλικίωσης παρέχονταν γεύμα αίματος όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 2.2. Τα ενήλικα (50 άτομα) που είχαν δεχτεί γεύμα αίματος μεταφέρονταν με αναρρόφηση σε κλωβό Plexi glass 15 x 15 x 15 cm (βλέπε Κεφάλαιο 2) για δέκα ημέρες με σκοπό την ωοτοκία (πέντε ημέρες για τη πέψη του αίματος και πέντε ημέρες για την ωοτοκία). Στα ενήλικα παρέχονταν διάλυμα ζάχαρης 10% w/v, ώστε να καλυφθούν οι διατροφικές τους ανάγκες. Την 6^η ημέρα μετά την πέψη του αίματος το δοχείο με διαστάσεις 7 x 10 x 2 cm που βρίσκονταν στο Plexi glass γέμιζε με νερό εκτροφής προνυμφών προκειμένου να διεγερθεί η ωοτοκία. Με το πέρας της ωοτοκίας καταμετρούνταν τα ωά από τις σχεδίες ωών, αφαιρούνταν το νερό από το δοχείο και συνεπώς η δυνατότητα απόθεσης και επόμενης σχεδίας ωών από το ενήλικο θηλυκό. Η κάθε σχεδία τοποθετούνταν σε πλαστικό κυλινδρικό δοχείο 500ml με παροχή τροφής ανά 2 ημέρες με σκοπό την ανάπτυξη των

[195]

προνυμφών. Με το πέρας του διαστήματος ωοτοκίας τα ενήλικα τοποθετούνταν σε πλαστικά διαφανή ποτήρια 400ml για να καταγραφεί η διάρκεια ζωής τους (βλέπε Κεφάλαιο 2).

Οι νύμφες μεταφέρονταν σε πλαστικό δοχείο 250 ml νερού με διαφανές καπάκι και καταμετρούνταν ο αριθμός τους, το ποσοστό τους σε συνάρτηση με τον αριθμό ωών κάθε σχεδίας, ο αριθμός των αρσενικών και θηλυκών ενήλικων απογόνων καθώς και η αναλογία φύλου.

Culex pipiens f. molestus

Για την ωοπαραγωγή χωρίς γεύμα αίματος, την 7^η ημέρα 50 άτομα μεταφέρονταν με αναρρόφηση σε κλωβό Plexi glass 15 x 15 x 15 cm (βλέπε Κεφάλαιο 2) όπως περιγράφηκε για δέκα ημέρες με σκοπό την ωοτοκία όπως συνέβη και στις συνθήκες παροχής γεύματος αίματος. Στα ενήλικα παρέχονταν διάλυμα ζάχαρης 10% w/v, ώστε να καλυφθούν οι διατροφικές τους ανάγκες. Την 7^η ημέρα γέμιζε με νερό εκτροφής προνυμφών το δοχείο 7 x 10 x 2 cm που βρίσκονταν στο Plexi glass με σκοπό να διεγείρει την ωοτοκία. Μετά από κάθε ωοτοκία καταμετρούνταν τα ωά από τις σχεδίες, αφαιρούνταν το νερό από το δοχείο και συνεπώς και η δυνατότητα απόθεσης και επόμενης σχεδίας ωών από το κουνούπι και η κάθε σχεδία τοποθετούνταν σε πλαστικό κυλινδρικό δοχείο 500ml με παροχή τροφής ανά 2 ημέρες με σκοπό την ανάπτυξη των προνυμφών. Με το πέρας του διαστήματος ωοτοκίας τα ενήλικα τοποθετούνταν σε πλαστικά διαφανή ποτήρια 400ml για να καταγραφεί η διάρκεια ζωής τους (βλέπε Κεφάλαιο 2).

Οι νύμφες μεταφέρονταν σε πλαστικό δοχείο 250 ml νερού με καπάκι διαφανές και καταμετρούνταν ο αριθμός τους, το ποσοστό τους σε συνάρτηση με τον αριθμό αυγών κάθε σχεδίας καθώς και ο αριθμός των αρσενικών και θηλυκών ενήλικων και η αναλογία φύλου.

Για την ωοπαραγωγή με γεύμα αίματος, την 7^η ημέρα της σύζευξης στα 50 ενήλικα θηλυκά τοποθετήθηκε στον κλωβό εκτροφής BugDorm-4F2222 Insect Rearing Cage 32,5 x 32,5 x 32,5 cm για 4 ημέρες πλαστικό κυλινδρικό δοχείο 500 ml με νερό από εκτροφή προνυμφών με σκοπό την ωοτοκία. Την 5^η ημέρα τα ενήλικα θηλυκά μεταφέρονταν με αναρρόφηση σε κλωβό Plexi glass 15 x 15 x 15 cm (βλέπε Κεφάλαιο 2) όπως περιγράφηκε για δέκα ημέρες με

[196]

σκοπό την ωοτοκία (πέντε ημέρες να πέψουν το αίμα και πέντε ημέρες να ωοτοκήσουν). Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως συνέβη με το *Cx. pipiens f. pipiens*.

7.4 Στατιστική ανάλυση

Η επίδραση του γεύματος αίματος στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων ελέγχθηκε με το πρότυπο ανάλογων κινδύνων Cox (Cox proportional hazards model). Η σύγκριση συζευγμένων θηλυκών με και χωρίς γεύμα αίματος ως προς την διάρκεια ζωής τους πραγματοποιήθηκε κατά ζεύγη με τον έλεγχο Log-rank (Mantel-Cox). Χρησιμοποιήθηκαν γενικευμένα γραμμικά μοντέλα (Generalised Linear Model- GLMs) ώστε να ελεγχθεί η επίδραση των γευμάτων αίματος (ένα και κανένα γεύματα αίματος) στα δημογραφικά χαρακτηριστικά όπως η ωοπαραγωγή, αριθμός νυμφών, ποσοστό αυγών που έγιναν νύμφες, αριθμός ενηλίκων, αριθμός αρσενικών και θηλυκών, αναλογία αρσενικών και θηλυκών. Για όλες τις αναλύσεις το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο $\alpha = 0,05$. Η ανάλυση των δεδομένων καθώς και η σχεδίαση των γραφημάτων έγινε με το IBM SPS 25 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

7.5 Αποτελέσματα

Επίδραση του γεύματος αίματος στα δημογραφικά χαρακτηριστικά των θηλυκών του *Culex pipiens f. pipiens*

Η μέση διάρκεια ζωής των ενηλίκων του *Cx. pipiens f. pipiens* με ένα γεύμα αίματος κυμάνθηκε από 57 – 65 ημέρες (log rank test, $p < 0,001$) (Πίνακας 7.1). Το γεύμα αίματος μείωσε τη διάρκεια ζωής των θηλυκών (Διάγραμμα 7.1). Για τη μεταχείριση χωρίς γεύμα αίματος χρησιμοποιήθηκαν 47 άτομα ενώ για το ένα γεύμα αίματος 52. Το μακροβιότερο θηλυκό χωρίς γεύμα αίματος έφτασε τις 39 – 107 ημέρες ενώ με γεύμα αίματος έφτασε τις 38 – 82 ημέρες. Η θνησιμότητα στα θηλυκά με και χωρίς γεύμα αίματος ως περίπου στην ηλικία των 40 ημερών ήταν αρκετά χαμηλή $<10\%$. Από την ηλικία των 40 περίπου ημερών παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της θνησιμότητας με αποτέλεσμα το 50% των θηλυκών με γεύμα αίματος να πεθάνουν ως την ηλικία των 60 ημερών ενώ εκείνα χωρίς γεύμα αίματος έζησαν μέχρι και 65 ημέρες. Το 80% θηλυκών

[197]

με γεύμα αίματος είχαν αποβιώσει έως και την ηλικία των 70 περίπου ημερών, ενώ εκείνα χωρίς γεύμα αίματος απεβίωσαν στις 80 περίπου ημέρες.

Το μοντέλο ανάλογων κινδύνων του Cox έδειξε ότι το γεύμα αίματος είχε σημαντική επίδραση στη διάρκεια ζωής των θηλυκών (Πίνακας 7.2).

Πίνακας 7.1 Διάρκεια ζωής ενήλικων συζευγμένων θηλυκών *Culex pipiens* f. *pipiens* χωρίς και με ένα γεύμα αίματος

Γεύμα αίματος	Διάρκεια ζωής (ημέρες $\pm$ SE)			
	Μέσος όρος	Τεταρτημόρια		
		25	50	75
Χωρίς γεύμα αίματος (n=47)	65,6 $\pm$ 2,0 ^α	73,0 $\pm$ 4,1	65,0 $\pm$ 2,2	58,0 $\pm$ 1,0
Ένα γεύμα αίματος (n=52)	57,5 $\pm$ 1,8 ^β	68,0 $\pm$ 2,5	60,0 $\pm$ 1,4	46,0 $\pm$ 3,1

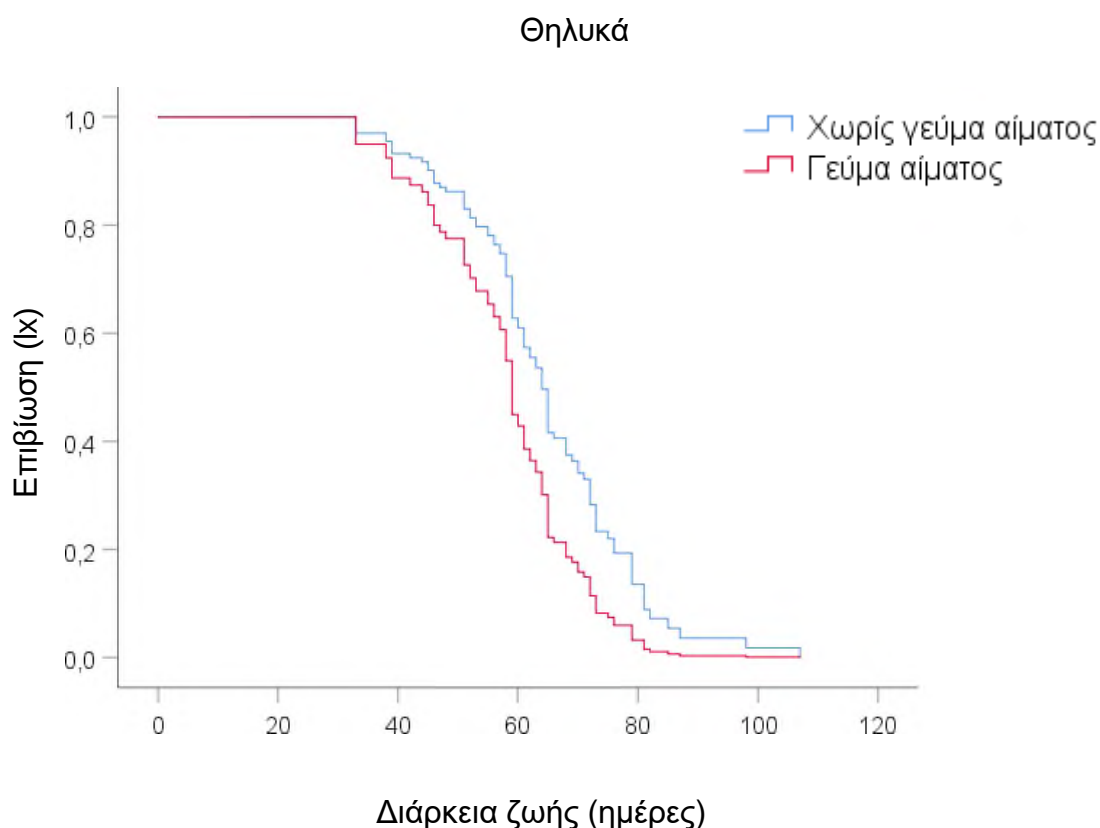
Στην ίδια στήλη οι τιμές που συνοδεύονται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (pairwise comparisons, log rank test, $p < 0,05$)

Πίνακας 7.2 Μεταβλητές του μοντέλου ανάλογων κινδύνων του Cox για την επίδραση του γεύματος αίματος στη διάρκεια ζωής των θηλυκών του *Culex pipiens* f. *pipiens*

Πηγή παραλλακτικότητας	$\beta \pm SE$	Exp(β)	p
Γεύμα αίματος	-0,540 $\pm$ 0,210	0,583	0,010

(Ομάδα αναφοράς: Ένα γεύμα αίματος)

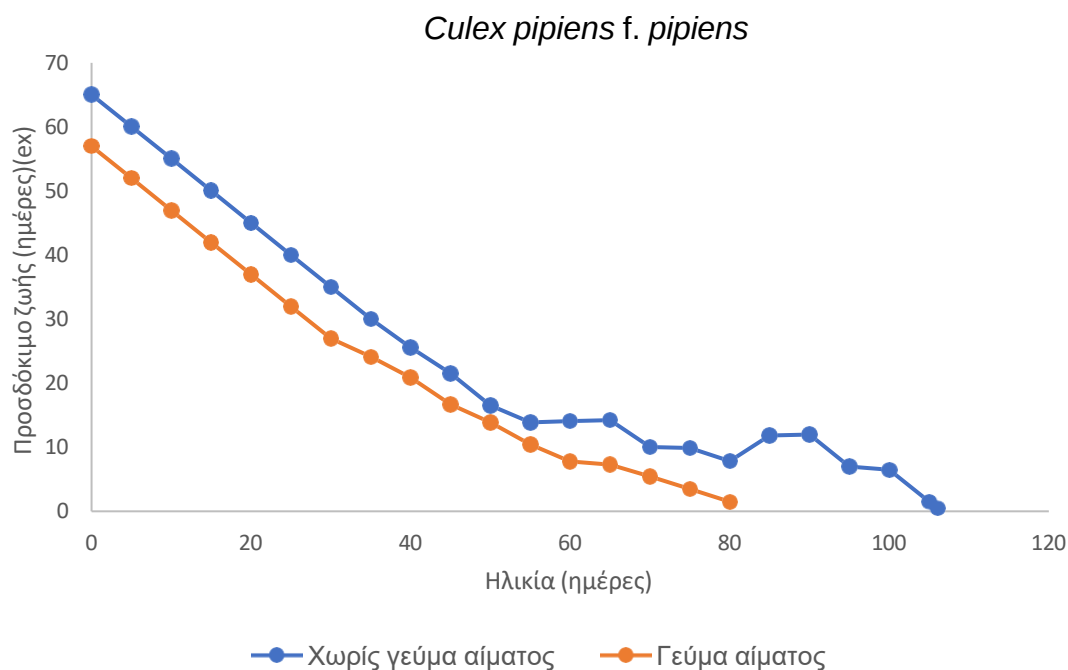
β εκτιμώμενοι συντελεστές στο μοντέλο παλινδρόμησης ανάλογων κινδύνων του Cox



Διάγραμμα 7.1 Αθροιστική καμπύλη επιβίωσης (lx) ενηλίκων θηλυκών του *Culex ripiens* f. *ripiens* χωρίς και με ένα γεύμα αίματος.

Υπολογίστηκε ο πίνακας ζωής των θηλυκών που τρέφονταν με γεύμα αίματος και εκείνων που δεν τρέφονταν με αίμα. Στο Διάγραμμα 7.2 απεικονίζεται το προσδόκιμο ζωής για θηλυκά του *Cx. ripiens* f. *ripiens* σε σχέση με το γεύμα. Στα θηλυκά χωρίς γεύμα αίματος όσο και σε εκείνα με γεύμα αίματος το προσδόκιμο ζωής βαίνει μειούμενο και παράλληλο. Το προσδόκιμο ζωής κατά την έξοδο των ενηλίκων από το νυμφικό περίβλημα είναι 56 ημέρες για τα θηλυκά που δεν έλαβαν γεύμα αίματος και 65 ημέρες για εκείνα που έλαβαν γεύμα αίματος. Οι διαφορές στο προσδόκιμο ζωής διατηρούνται για όλη τη ζωή. Για παράδειγμα την ημέρα 20 το προσδόκιμο ζωής ήταν 35 και 45 ημέρες για τα θηλυκά που έλαβαν αλλά και για εκείνα που δεν έλαβαν γεύμα αίματος, αντίστοιχα. Το προσδόκιμο ζωής χωρίς γεύμα αίματος αυξάνει από περίπου την 55^η ημέρα μέχρι και την 90^η, ενώ μετά μειώνεται έως και τον θάνατο του τελευταίου ενήλικου ατόμου την 107^η ημέρα. Αντίθετα, τα θηλυκά

με γεύμα αίματος διατηρούν τη μειούμενη πορεία του προσδόκιμου ζωής έως και το θάνατο του τελευταίου ενήλικου ατόμου την 82^η ημέρα.



Διάγραμμα 7.2 Σχέση του προσδόκιμου ζωής με την ηλικία (ημέρες) ενηλίκων θηλυκών του *Culex pipiens f. pipiens* χωρίς και με ένα γεύμα αίματος.

Η μέση διάρκεια ζωής των ενηλίκων του *Culex pipiens f. molestus* με και χωρίς γεύμα αίματος κυμάνθηκε από 43 – 45 ημέρες (log rank test, $p > 0,05$) (Πίνακας 7.3). Για τη μεταχείριση χωρίς γεύμα αίματος χρησιμοποιήθηκαν 50 θηλυκά άτομα ενώ για εκείνη με γεύμα αίματος 38. Το μακροβιότερο θηλυκό χωρίς γεύμα αίματος έφτασε τις 24 – 70 ημέρες ενώ με γεύμα αίματος έφτασε τις 25 – 79 ημέρες. Η θνησιμότητα στα θηλυκά με και χωρίς γεύμα αίματος ως περίπου στην ηλικία των 30 ημερών ήταν $<10\%$. Από την ηλικία των 30 περίπου ημερών παρατηρήθηκε αύξηση της θνησιμότητας με αποτέλεσμα το 50% των θηλυκών με και χωρίς με γεύμα αίματος να πεθάνουν ως την ηλικία των 45 ημερών. Το 80% θηλυκών με και χωρίς γεύμα αίματος είχαν αποβιώσει έως και την ηλικία των 60 περίπου ημερών.

Το μοντέλο ανάλογων κινδύνων του Cox έδειξε πως το γεύμα αίματος δεν είχε σημαντική επίδραση στη διάρκεια ζωής των ενηλίκων (Πίνακας 7.4).

Πίνακας 7.3 Διάρκεια ζωής ενήλικων συζευγμένων θηλυκών του *Culex pipiens* f. *molestus* χωρίς και με ένα γεύμα αίματος.

Γεύμα αίματος	Διάρκεια ζωής (ημέρες $\pm$ SE)			
	Μέσος όρος	Τεταρτημόρια		
		25	50	75
Χωρίς γεύμα αίματος (n=50)	45,2 $\pm$ 1,4 ^a	52,0 $\pm$ 2,5	45,0 $\pm$ 1,8	39,0 $\pm$ 2,1
Ένα γεύμα αίματος (n=38)	44,4 $\pm$ 2,5 ^a	58,0 $\pm$ 4,2	45,0 $\pm$ 3,9	30,0 $\pm$ 2,7

Τιμές εντός της ίδιας στήλης που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν σημαντικά $p > 0,05$

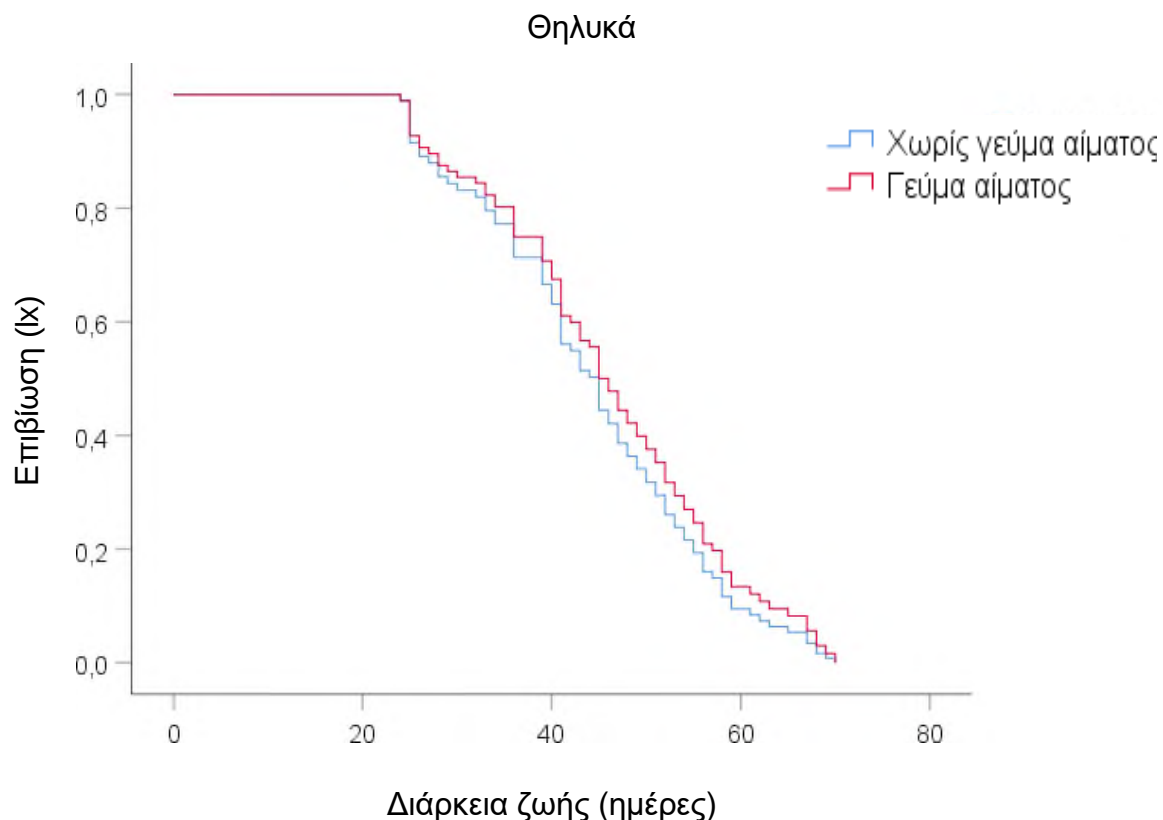
Πίνακας 7.4 Μεταβλητές του μοντέλου ανάλογων κινδύνων του Cox ενηλίκων χωρίς και με ένα γεύμα αίματος

Πηγή παραλλακτικότητας	$\beta \pm SE$	Exp(β)	p
Χωρίς γεύμα αίματος	0,158 $\pm$ 0,222	1,171	0,476
Ένα γεύμα αίματος (ομάδα αναφοράς)			

β εκτιμώμενοι συντελεστές στο μοντέλο παλινδρόμησης ανάλογων κινδύνων του Cox

Στο Διάγραμμα 7.3 δίνεται η επιβίωση των ενηλίκων θηλυκών σε σχέση με το γεύμα αίματος. Φαίνεται πως το γεύμα αίματος δεν επηρέασε τη διάρκεια ζωής των θηλυκών ($p > 0,05$).

Η θνησιμότητα των θηλυκών χωρίς και με γεύμα αίματος έως την ηλικία των 30 περίπου ημερών ήταν $<10\%$. Έκτοτε παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της θνησιμότητας με αποτέλεσμα το 50% των θηλυκών χωρίς και με γεύμα αίματος να πεθάνουν ως την ηλικία των 50 περίπου ημερών. Το 80% των θηλυκών είχαν πεθάνει έως την ηλικία των 58 ημερών

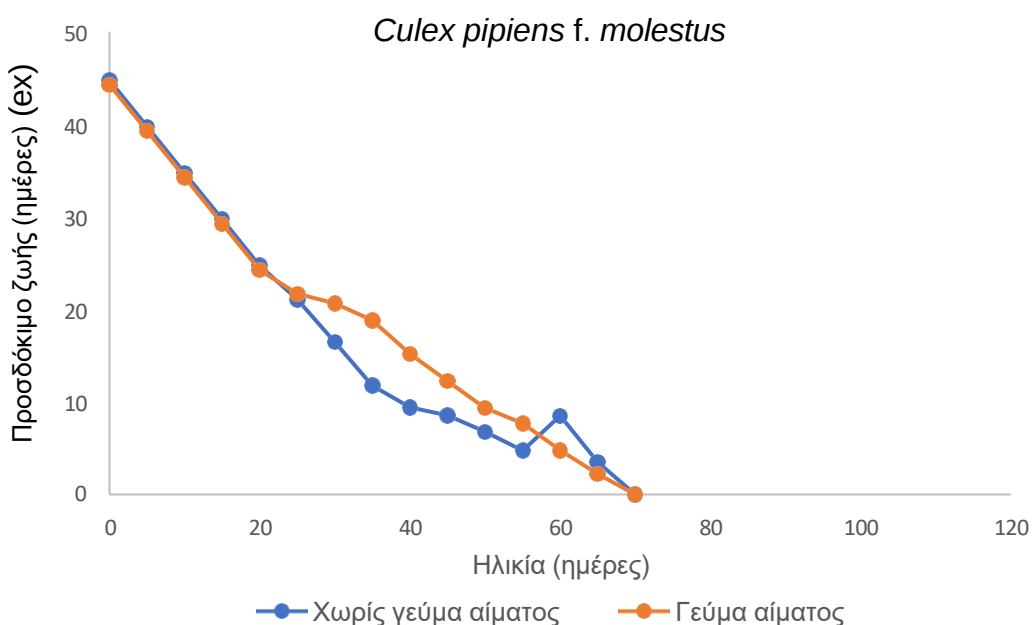


Διάγραμμα 7.3 Αθροιστική καμπύλη επιβίωσης (l_x) ενηλίκων θηλυκών του *Culex ripiens f. molestus* χωρίς και με ένα γεύμα αίματος.

Δημιουργήθηκε ο πίνακας ζωής των θηλυκών που τρέφονται με γεύμα αίματος και εκείνων που δεν τρέφονται με γεύμα αίματος. Στο Διάγραμμα 7.4 απεικονίζεται το προσδόκιμο ζωής για συζευγμένα ενήλικα θηλυκά του *Cx. ripiens f. molestus* χωρίς και με γεύμα αίματος. Το προσδόκιμο ζωής κατά την έξοδο των ενηλίκων από το νυμφικό περίβλημα είναι περίπου 44 ημέρες για τα θηλυκά που δεν έλαβαν γεύμα αίματος όσο και για εκείνα που έλαβαν γεύμα αίματος. Οι διαφορές στο προσδόκιμο ζωής διατηρούνται για όλη τη ζωή. Για παράδειγμα την ημέρα 20 το προσδόκιμο ζωής ήταν περίπου 25 ημέρες για τα θηλυκά που έλαβαν αλλά και για εκείνα που δεν έλαβαν γεύμα αίματος, αντίστοιχα.

Στα θηλυκά χωρίς γεύμα αίματος όσο και σε εκείνα με γεύμα αίματος το προσδόκιμο ζωής βαίνει μειούμενο και μέχρι την 30^η ημέρα ταυτίζεται, στη συνέχεια το προσδόκιμο ζωής χωρίς γεύμα αίματος συνεχίζει να μειώνεται

ενώ εκείνο με γεύμα αίματος αυξάνει και στη συνέχεια έχει φθίνουσα πορεία. Το προσδόκιμο ζωής των συζευγμένων θηλυκών χωρίς και με γεύμα αίματος έως και την ηλικία των 25 ημερών ήταν ίδιο, ενώ μετά αυξήθηκε για τα θηλυκά με γεύμα αίματος διατηρώντας τη φθίνουσα πορεία έως και την ηλικία των 60 ημερών όπου τα θηλυκά χωρίς γεύμα αίματος εμφάνισαν μεγαλύτερο προσδόκιμο ζωής. Οι δύο καμπύλες ταυτίζονται για δεύτερη φορά περίπου την 55^η ημέρα μετά τη στιγμιαία αύξηση του προσδόκιμου ζωής από τα θηλυκά χωρίς γεύμα αίματος και ακολουθούν πτωτική πορεία μέχρι και τον θάνατο του τελευταίου στις 71 και 70 ημέρες αντίστοιχα.

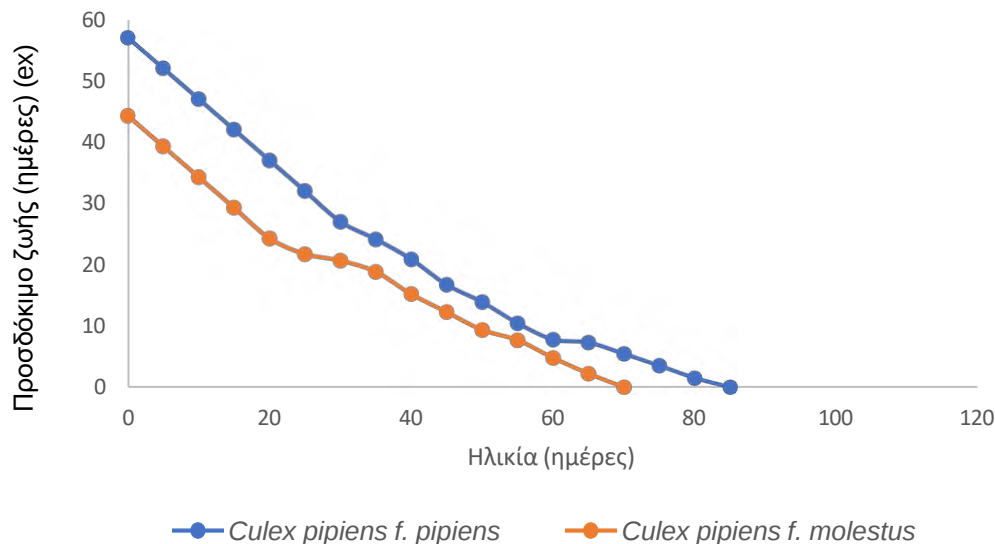


Διάγραμμα 7.4 Σχέση του προσδόκιμου ζωής με την ηλικία ενήλικων θηλυκών του *Culex pipiens f. pipiens* χωρίς και με γεύμα αίματος.

Έγινε ανάλυση των στοιχείων για τα θηλυκά και των δύο βιοτύπων με γεύμα αίματος. Στο Διάγραμμα 7.5 απεικονίζεται το προσδόκιμο ζωής για ενήλικα θηλυκά του *Cx. pipiens f. pipiens* που είναι υψηλότερο σε σχέση με εκείνο του *Cx. pipiens f. molestus* αλλά και στους δύο βιότυπους βαίνει μειούμενο και παράλληλο. Το προσδόκιμο ζωής κατά την έξοδο των ενήλικων από το νυμφικό περίβλημα είναι περίπου 65 ημέρες για τα θηλυκά του *Cx. pipiens f. pipiens* που έλαβαν γεύμα αίματος και 44 για εκείνα του *Cx. pipiens f. molestus* με γεύμα αίματος. Οι διαφορές στο προσδόκιμο ζωής διατηρούνται για όλη τη ζωή. Για παράδειγμα την ημέρα 20 το προσδόκιμο

ζωής ήταν περίπου 25 ημέρες για τα θηλυκά που έλαβαν αλλά και για εκείνα που δεν έλαβαν γεύμα αίματος, αντίστοιχα. Οι δύο καμπύλες είναι παράλληλες και ακολουθούν πτωτική πορεία μέχρι και τον θάνατο του τελευταίου ατόμου στις 71 και 82 ημέρες αντίστοιχα.

Γεύμα αίματος



Διάγραμμα 7.5 Σχέση του προσδόκιμου ζωής με την ηλικία (ημέρες) ενηλίκων θηλυκών του *Culex pipiens f. pipiens* και του *Culex pipiens f. molestus* με ένα γεύμα αίματος

Επίδραση του γεύματος αίματος στα δημογραφικά χαρακτηριστικά των θηλυκών *Culex pipiens f. pipiens* και *Culex pipiens f. molestus*

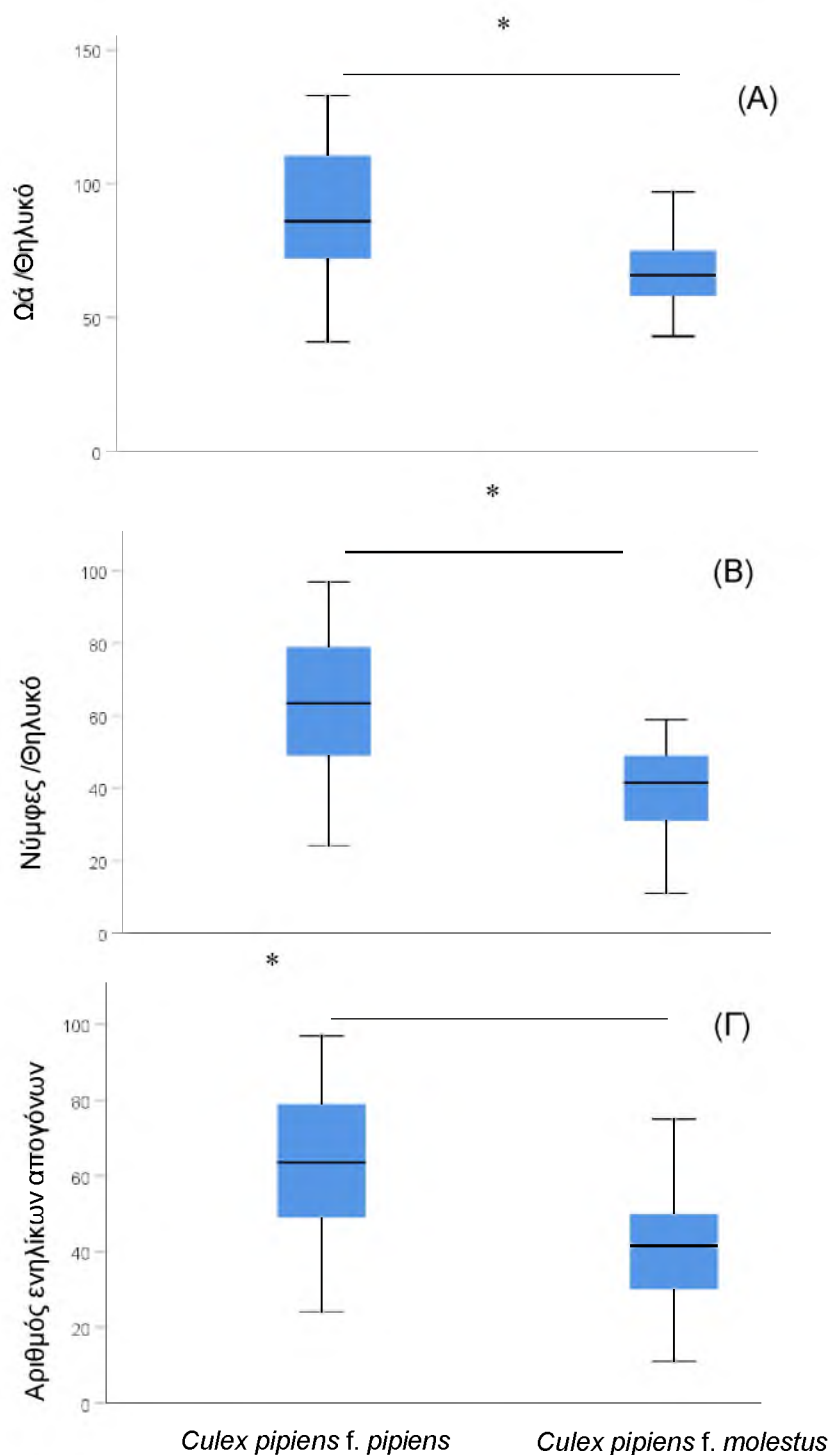
Στον Πίνακα 7.5 δίνονται τα στοιχεία που αφορούν την επίδραση του γεύματος αίματος στην ωοπαραγωγή και στα χαρακτηριστικά των απογόνων των θηλυκών του *Cx. pipiens f. pipiens* και του *Cx. pipiens f. molestus* για ένα γεύμα αίματος.

Το γεύμα αίματος είχε σημαντική επίδραση στις παραμέτρους της αναπαραγωγής του *Cx. pipiens f. pipiens* ($p < 0,05$) που ήταν υψηλότερες σε σχέση με την ομάδα αναφοράς (*Cx. pipiens f. molestus*) όπως άλλωστε απεικονίζονται στα παρακάτω θηκογράμματα για κάθε παράμετρο (Διάγραμμα 7.6 – 7.7). Το ίδιο ίσχυσε και για όλες τις υπόλοιπες παραμέτρους εκτός από την αναλογία αρσενικών/θηλυκών απογόνων των αρσενικών $p=0,032$.

Πίνακας 7.5 Γενικευμένο γραμμικό μοντέλο για την επίδραση ενός γεύματος αίματος στα δημογραφικά χαρακτηριστικά των *Culex pipiens* f. *pipiens* και *Culex pipiens* f. *molestus*

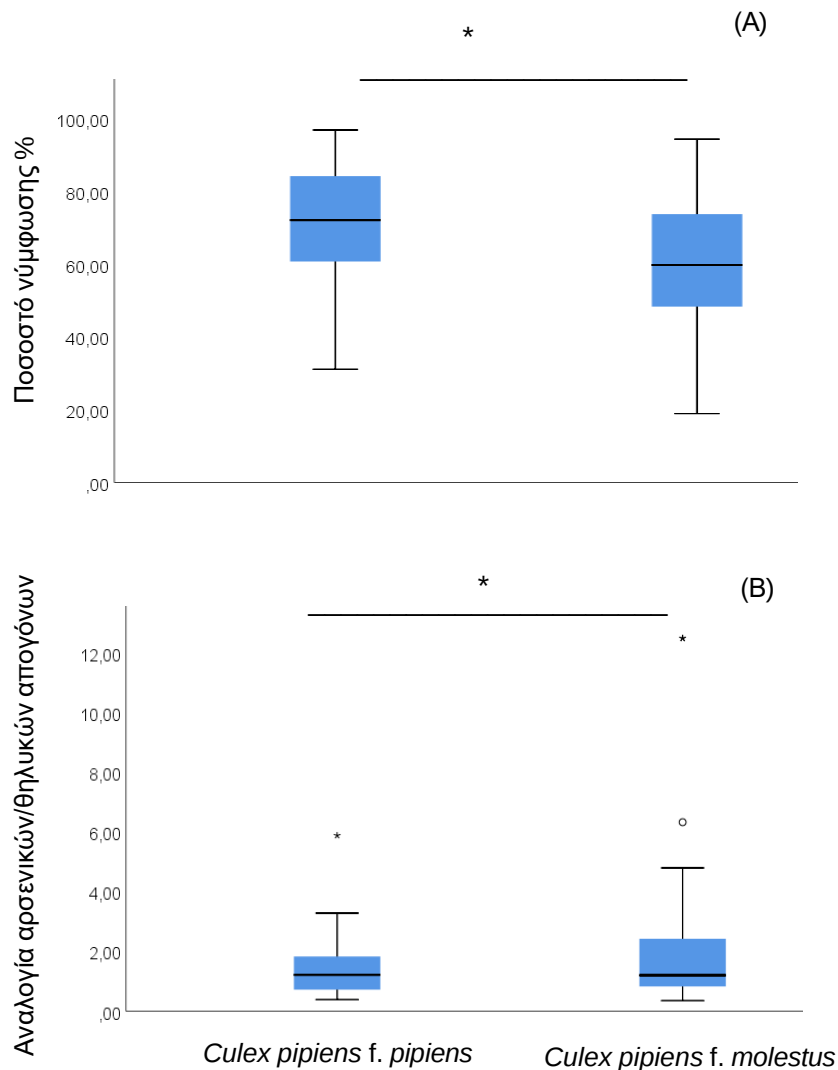
Μεταβλητή	B	Wald χ^2 **	p
Ωοπαραγωγή/Θηλυκό	22,929	29,852	<0,001
Νύμφες/Θηλυκό	23,569	52,125	<0,001
Ποσοστό νύμφωσης %	11,786	13,222	<0,001
Αριθμός ενηλίκων απογόνων	22,810	45,679	<0,001
Αριθμός αρσενικών απογόνων	9,804	27,849	<0,001
Αριθμός θηλυκών απογόνων	13,043	21,815	<0,001
Αναλογία αρσενικών/θηλυκών απογόνων	-0,833	4,601	0,032
*Ομάδα αναφοράς: <i>Culex pipiens</i> f. <i>molestus</i> **df=1			

Στο Διάγραμμα 7.6 δίνεται η ωοπαραγωγή και ο αριθμός των νυμφών και των ενηλίκων απογόνων για το *Cx. pipiens* f. *pipiens* και για το *Cx. pipiens* f. *molestus*. Το γεύμα αίματος αύξησε την ωοπαραγωγή των θηλυκών του *Cx. pipiens* f. *pipiens* κατά περίπου 30 ωά ανά θηλυκό σε σχέση με εκείνη του *Cx. pipiens* f. *molestus* (Διάγραμμα 7.6). Αντίστοιχη ήταν και η επίδρασή του και στις παραγόμενες νύμφες και στους ενήλικους απογόνους.



Διάγραμμα 7.6 Επίδραση του γεύματος αίματος στην ωοπαραγωγή (Α), στον αριθμό των παραγόμενων νυμφών (Β) και στον αριθμό των ενηλίκων απογόνων (αρσενικών και θηλυκών) (Γ) στο *Culex pipiens f. pipiens* και στο *Culex pipiens f. molestus* (Βλ. Παράρτημα VI). Ο αστερίσκος (*) δείχνει σημαντική διαφορά ($p < 0,05$).

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 7.7 το ποσοστό νύμφωσης με ένα γεύμα αίματος του *Culex pipiens* f. *pipiens* ήταν μεγαλύτερο σε σχέση με εκείνο του *Cx. pipiens* f. *molestus*. Η αναλογία αρσενικών/θηλυκών απογόνων στο *Cx. pipiens* f. *molestus* είχε ευρύτατη διασπορά με εμφάνιση εξαιρετικά ακραίων έως >12 τιμών σε αντίθεση με το *Cx. pipiens* f. *pipiens* όπου η ακραία τιμή της αναλογίας δεν ξεπέρασε τη τιμή 6.



Διάγραμμα 7.7 Επίδραση του γεύματος αίματος στο ποσοστό νύμφωσης (A), και στην αναλογία αρσενικών / θηλυκών απογόνων (B) στο *Culex pipiens* f. *pipiens* και στο *Culex pipiens* f. *molestus*. Το (*) δείχνει σημαντική διαφορά ($p < 0,05$, Διάγραμμα 7.7).

Πείραμα 4: Επίδραση του γεύματος αίματος στα ωοπαραγωγικά χαρακτηριστικά των θηλυκών του *Culex pipiens f. molestus*

Στον Πίνακα 7.6 δίνονται τα στοιχεία που αφορούν τα ωοπαραγωγικά χαρακτηριστικά του *Cx. pipiens f. molestus* με και χωρίς γεύμα αίματος. Η απουσία γεύματος αίματος είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στις ωοπαραγωγικές παραμέτρους του *Cx. pipiens f. molestus* των οποίων οι τιμές ήταν υψηλότερες σε σχέση με την ομάδα αναφοράς (ένα γεύμα αίματος) όπως άλλωστε απεικονίζονται στα παρακάτω θηκογράμματα για κάθε παράμετρο. Το ίδιο ίσχυσε για όλες τις παραμέτρους εκτός από τον αριθμό των αρσενικών απογόνων $p=0,399$.

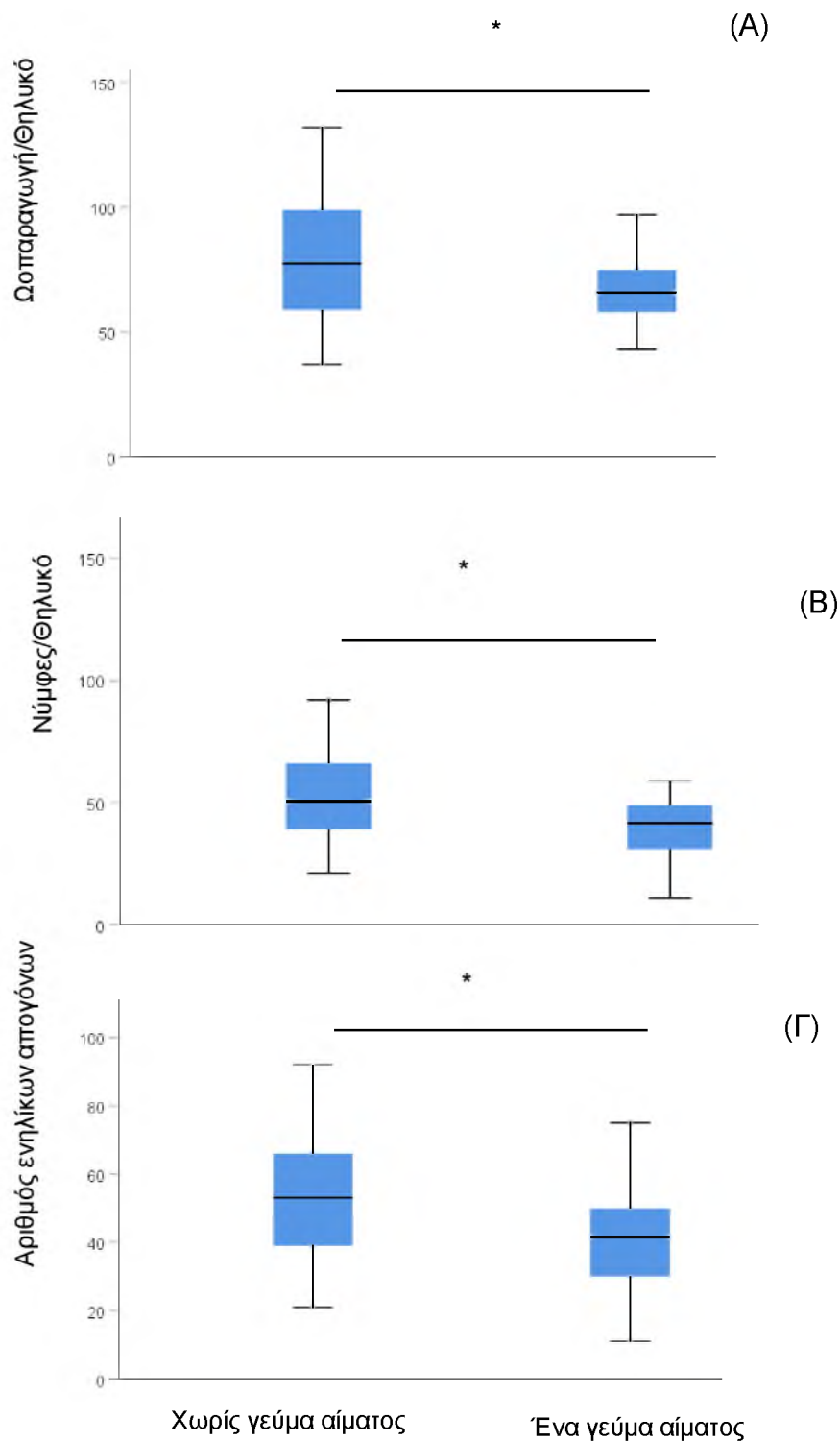
Πίνακας 7.6 Γενικευμένο γραμμικό μοντέλο για την επίδραση του γεύματος αίματος στα δημογραφικά χαρακτηριστικά του *Culex pipiens f. molestus**

Μεταβλητή	B	Wald χ^{2**}	p
Ωοπαραγωγή/Θηλυκό	13,135	8,740	0,003
Νύμφες/Θηλυκό	14,446	19,563	<0,001
Ποσοστό νύμφωσης %	9,635	7,279	0,007
Αριθμός ενηλίκων απογόνων	13,984	16,993	<0,001
Αριθμός αρσενικών απογόνων	1,533	0,713	0,399
Αριθμός θηλυκών απογόνων	12,372	25,683	<0,001
Αναλογία αρσενικών/θηλυκών απογόνων	-1,418	10,886	0,001

*Ομάδα αναφοράς: ένα γεύμα αίματος,

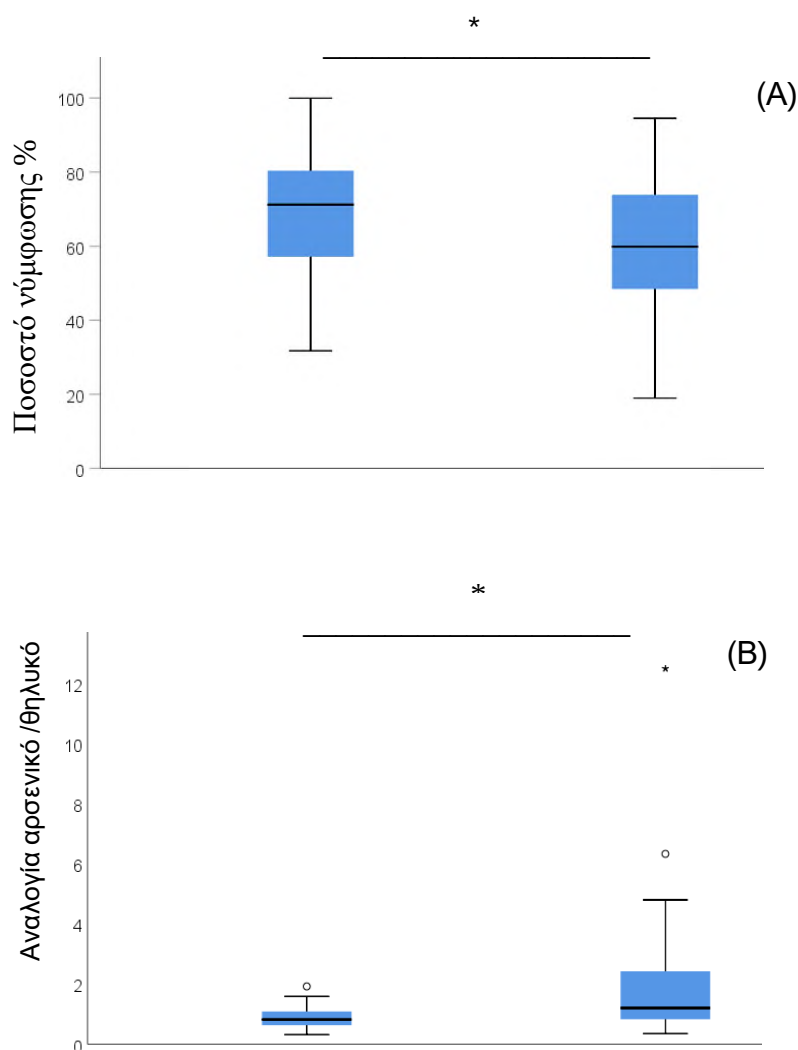
**df=1

Στο Διάγραμμα 7.8 δίνεται η ωοπαραγωγή και ο αριθμός των νυμφών και των ενηλίκων απογόνων του *Cx. pipiens f. molestus* με και χωρίς γεύμα αίματος. Η ωοπαραγωγή χωρίς γεύμα αίματος ήταν αυξημένη κατά περίπου 15 ώα ανά θηλυκό σε σχέση με την ωοπαραγωγή με γεύμα αίματος (Διάγραμμα 7.8). Αντίστοιχη ήταν και η επίδρασή του και στις παραγόμενες νύμφες και στους ενήλικες απογόνους.



Διάγραμμα 7.8 Επίδραση του γεύματος αίματος στην ωοπαραγωγή (Α), στον αριθμό των νυμφών (Β) και στον αριθμό των ενηλίκων απογόνων (αρσενικών και θηλυκών) (Γ) στο *Culex pipiens f. molestus* με και χωρίς γεύμα αίματος (Βλ. Παράρτημα VI). Ο αστερίσκος (*) δείχνει σημαντική διαφορά ($p < 0,05$, Διάγραμμα 7.8).

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 7.9 το ποσοστό νύμφωσης χωρίς γεύμα αίματος στο *Cx. pipiens* f. *molestus* είναι μεγαλύτερο σε σχέση με ένα γεύμα αίματος. Η αναλογία αρσενικών/θηλυκών απογόνων στο ένα γεύμα αίματος είχε ευρύτατη διασπορά με εμφάνιση εξαιρετικά ακραίων έως >12 τιμών σε αντίθεση με την αναλογία αρσενικών/θηλυκών απογόνων χωρίς γεύμα αίματος όπου η ακραία τιμή της αναλογίας δεν ξεπέρασε τη τιμή 2.



Διάγραμμα 7.9 Επίδραση του γεύματος αίματος στο ποσοστό νύμφωσης (Δ), και στην αναλογία αρσενικών / θηλυκών απογόνων (Ε) στο *Culex pipiens* f. *molestus*. Ο αστερίσκος (*) δείχνει σημαντική διαφορά ($p < 0,05$, Διάγραμμα 7.9).

7.6 Συζήτηση

Τα αποτελέσματα του παρόντος κεφαλαίου έδειξαν ότι α) το γεύμα αίματος μείωσε τη διάρκεια ζωής του *Cx. pipiens f. pipiens* όχι όμως και του *Cx. pipiens f. molestus* β) η επίδραση του γεύματος αίματος όσον αφορά τις δημογραφικές παραμέτρους ήταν διαφορετική στο *Cx. pipiens f. pipiens* σε σχέση με το *Cx. pipiens f. molestus*. Συγκεκριμένα, το γεύμα αίματος αύξησε την ωοπαραγωγή των θηλυκών του *Cx. pipiens f. pipiens* κατά περίπου 30 ωά ανά θηλυκό σε σχέση με εκείνη του *Cx. pipiens f. molestus*. Αντίστοιχη ήταν και η επίδρασή του και στις παραγόμενες νύμφες και στους ενήλικους απογόνους γ) Το γεύμα αίματος δεν αύξησε την ωοπαραγωγή και τα χαρακτηριστικά της ωοπαραγωγής στο *Cx. pipiens f. molestus*.

Η επίδραση του γεύματος αίματος στη διάρκεια ζωής ενηλίκων θηλυκών του *Cx. pipiens f. pipiens* και του *Cx. pipiens f. molestus* δεν έχει μελετηθεί σε προηγούμενες έρευνες και συνεπώς δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία για σύγκριση. Ειδικότερα, το γεύμα αίματος μείωσε κατά περίπου δέκα ημέρες τη διάρκεια ζωής των συζευγμένων θηλυκών του *Cx. pipiens f. pipiens*. Πιο συγκεκριμένα, στα θηλυκά χωρίς γεύμα αίματος τόσο στο 25% όσο και στο 50% το προσδόκιμο ζωής ήταν περίπου 14 ημέρες, ενώ με γεύμα αίματος το προσδόκιμο ζωής μειώθηκε κατά περίπου 6 ημέρες στα ίδια ποσοστά επιβίωσης.

Μείωση στη διάρκεια ζωής των συζευγμένων θηλυκών με γεύμα αίματος υπήρξε και στο *Cx. pipiens f. molestus*. Πιο συγκεκριμένα, στα θηλυκά χωρίς γεύμα αίματος το προσδόκιμο ζωής από το 25% στο 50% της επιβίωσης μειώθηκε κατά περίπου τρεις ημέρες, ενώ με γεύμα αίματος μειώθηκε κατά περίπου 9 ημέρες στα ίδια ποσοστά θνησιμότητας. Φαίνεται πως για τα ίδια ποσοστά επιβίωσης το προσδόκιμο ζωής είναι μεγαλύτερο με γεύμα αίματος αλλά η μείωσή του είναι τρεις φορές γρηγορότερη με εκείνη χωρίς γεύμα αίματος, όμως παραμένει υψηλότερο.

Οι διαφορές στη μακροβιότητα μεταξύ του *Cx. pipiens* f. *pipiens* και του *Cx. pipiens* f. *molestus* χωρίς γεύμα αίματος (107 και 70 ημέρες αντίστοιχα) και με ένα γεύμα αίματος (79 και 69 ημέρες αντίστοιχα) καταδεικνύουν την ανάγκη για ανάπτυξη διαφορετικών στρατηγικών καταπολέμησης. Συνεπώς, σε αγροτικές περιοχές που είναι πιθανότερο να βρεθεί το *Cx. pipiens* f. *pipiens* βάσει της ορνιθοφιλικής τάσης του, θα υπάρξει διαφορετική προσέγγιση καταπολέμησης σε σχέση με τις αστικές περιοχές όπου επικρατεί το *Cx. pipiens* f. *molestus*. Σε κάθε περίπτωση πρέπει να γίνεται εκτίμηση της αναλογίας των δύο βιοτύπων και των υβριδίων τους πριν ληφθούν σχετικές αποφάσεις καταπολέμησης.

Σχετικά με την επίδραση του γεύματος αίματος στα δημογραφικά χαρακτηριστικά του *Cx. pipiens* f. *pipiens* και του *Cx. pipiens* f. *molestus* οι έρευνες είναι λιγοστές και επικεντρώνονται στο *Cx. pipiens* f. *pipiens* (ωοπαραγωγή ανά θηλυκό, γονιμότητα) χωρίς να μελετούν πόσα ωά έγιναν ενήλικα ούτε την αναλογία του φύλου αυτών, στοιχεία στα προγράμματα κωνωποκτονίας που καθορίζουν την πληθυσμιακή δυναμική των πληθυσμών.

Στο παρόν κεφάλαιο με τη λήψη γεύματος αίματος όλα τα ωοπαραγωγικά χαρακτηριστικά (ωά/θηλυκό, νύμφες/θηλυκό, ποσοστό νύμφωσης (%), αριθμός ενηλίκων απογόνων, ο αριθμός αρσενικών και θηλυκών απογόνων, αναλογία απογόνων) του *Cx. pipiens* f. *pipiens* διέφεραν σημαντικά σε σχέση με τα αντίστοιχα του *Cx. pipiens* f. *molestus*. Στις παραμέτρους που παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά υπερεπέρβησε το *Culex pipiens* f. *pipiens* σε σχέση με το *Cx. pipiens* f. *molestus*, εκτός από την αναλογία αρσενικών και θηλυκών απογόνων που δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Το συγκεκριμένο εύρημα πιθανώς σχετίζεται με την βιολογία του κάθε βιοτύπου και την στρατηγική επιβίωσης και αρμοστικότητας.

Ειδικότερα, το *Cx. pipiens* f. *pipiens* έχει υπέρβηκα καταγωγή σε αντίθεση με το *Cx. pipiens* f. *molestus* που φαίνεται να βρέθηκε σε υπόβηκα τούνελ. Συνεπώς, ακόμη και αν το *Cx. pipiens* f. *molestus* ενίσχυσε την παρουσία του

υπέργεια, τα ευρήματα υποδηλώνουν πως δεν έχει προσαρμοστεί πλήρως στο «νέο» περιβάλλον. Το *Cx. pipiens* f. *pipiens* αξιοποιεί καλύτερα τις πρωτεΐνες του γεύματος αίματος σε σχέση με το *Cx. pipiens* f. *molestus* ώστε να επιμηκύνει την διάρκεια ζωής του θηλυκού και να έχει περισσότερους γονοτροφικούς κύκλους με το μέγιστο αριθμό απογόνων. Αυτό συμβαίνει γιατί έχει περιορισμένο χρονικό διάστημα αναπαραγωγής και ωοτοκίας καθώς οι περιβαλλοντικές συνθήκες υπαγορεύουν υποχρεωτική διάπαυση.

Αντίθετα, το *Cx. pipiens* f. *molestus* βρίσκεται σε κλειστούς χώρους, δηλαδή είτε σε υπόγεια είτε σε υπέργεια ενδιαιτήματα με σχετικά σταθερές συνθήκες. Στα ενδιαιτήματα επικρατούν σχετικά σταθερές θερμοκρασίες, ασφαλές περιβάλλον από αρπακτικά, ευκολότερη εύρεση του αντίθετου φύλου για σύζευξη καθώς και μεγαλύτερη πιθανότητα εύρεσης ξενιστή (ανθρώπου) για τη λήψη γεύματος αίματος. Συνεπώς, η αναπαραγωγή των γενεών μπορεί να συνεχιστεί καθ' όλη την διάρκεια του έτους και να εξασφαλιστεί η διαιώνιση του βιοτύπου ακόμη και με μικρότερη διάρκεια ζωής καθώς και αριθμό ωών και απογόνων.

Αρκετές είναι οι έρευνες που έχουν ασχοληθεί με την επίδραση του γεύματος αίματος στα χαρακτηριστικά της ωοπαραγωγής του *Cx. pipiens* f. *pipiens*. Ειδικότερα, οι Johnson & Fonseca (2014) βρήκαν σημαντική διαφορά στην ωοπαραγωγή σε σχέση με την παρούσα έρευνα που πιθανώς να οφείλεται τόσο στην διαφορά της πηγής του γεύματος αίματος (ορτύκι και ανθρώπινο αντίστοιχα) όσο κυρίως όσο και στην προκλητή ωορηξία. Οι Ιοαννου και συν. (2021) βρήκαν μειωμένη ωοπαραγωγή με σημαντική διαφορά σε σχέση με την παρούσα έρευνα και μπορεί να οφείλεται στην διαφορετική πειραματική διαδικασία και κυρίως στη θερμοκρασία. Η θερμοκρασία επηρέασε την διεργασία της πέψης του γεύματος αίματος καθώς και την στρατηγική επιβίωσης του ενήλικου θηλυκού κουνουπιού. Συνεπώς, η καταλληλότερη στρατηγική επιβίωσης για το ενήλικο ήταν η παρατεταμένη διάρκεια ζωής και η μειωμένη ωοπαραγωγή μέχρι η θερμοκρασία να αυξηθεί σε επίπεδα με περισσότερες πιθανότητες επιβίωσης για τους απογόνους.

Σε έρευνα των Al-Rashidi και συν. (2022) εμφανίζεται σημαντική διαφορά σε σχέση με την παρούσα έρευνα που αφορά τόσο την υψηλότερη

ωοπααραγωγή όσο και στην εκκολαψιμότητα των ωών, δείκτης που μετρήθηκε στο στάδιο της νύμφης. Οι διαφορές στην ωοτοκία έγκεινται σε αρκετές παραμέτρους. Στην προαναφερθείσα έρευνα των Al-Rashidi και συν. (2022) η φυλή προέρχονταν από τη Σαουδική Αραβία, μέρος με υψηλές θερμοκρασίες και υγρασία καθ' όλη την διάρκεια της ημέρας αλλά και τη νύχτα. Συνεπώς, αφού το πιο πιθανό είναι η αναμενόμενη διάρκεια ζωής να μην είναι υψηλή καθώς σε προγενέστερες μελέτες έχει αποδειχτεί πως η υψηλή θερμοκρασία μειώνει την διάρκεια ζωής των ενηλίκων, ως στρατηγική επιβίωσης του συγκεκριμένου βιοτύπου προκρίνεται η υψηλή ωοτοκία. Επιπλέον, στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία δεν αναφέρεται η ποσότητα του γεύματος αίματος που έλαβαν τα θηλυκά κουνούπια. Πιθανώς ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με την παρούσα έρευνα αφού τα θηλυκά κουνούπια για 12 ώρες πριν το γεύμα αίματος στερούνταν την πρόσβαση σε υδατικό διάλυμα ζάχαρης. Η προκληθείσα αφυδάτωση επέτρεψε να υπάρχει στην κοιλία περισσότερος διαθέσιμος χώρος για το γεύμα αίματος. Η διαφορά που παρατηρείται στην εκκολαψιμότητα δεν είναι συγκρίσιμη καθώς στην έρευνα των Al-Rashidi και συν. (2022) αναφέρεται στο πρώτο στάδιο των προνυμφών ενώ στην παρούσα έρευνα στο στάδιο της νύμφης. Στην πραγματικότητα ένα μέρος των προνυμφών για διάφορους λόγους δεν νυμφώνεται (κανιβαλισμός, ελλιπής πρόσβαση σε τροφή), συνεπώς η σύγκριση θα ήταν εφικτή εφόσον αναφέρονταν και οι δύο έρευνες στο ποσοστό νύμφωσης.

Σε άλλη έρευνα, οι Hamama και συν. (2022) βρήκαν σημαντική διαφορά σε σχέση με την παρούσα έρευνα στην ωοπααραγωγή με γεύμα αίματος από περιστέρι και πιθανώς να οφείλεται τόσο στην διαφορά της πηγής του γεύματος αίματος (περιστέρι και ανθρώπινο) όσο κυρίως στη στρατηγική επιβίωσης της συγκεκριμένης φυλής (Αίγυπτος) προκειμένου να επιβιώσει στις κλιματολογικές συνθήκες. Είναι άξιο προσοχής το γεγονός πως η διάρκεια ζωής των ενηλίκων είναι 6 ημέρες, συνεπώς η στρατηγική επιβίωσης του είδους είναι το υψηλό αναπαραγωγικό δυναμικό καθώς οι κλιματολογικές συνθήκες της χώρας έχουν άμεση επίπτωση στην διάρκεια ζωής των ενηλίκων και μειώνουν τον αριθμό των γονοτροφικών κύκλων.

Το γεύμα αίματος επηρεάζει τα ωοπααραγωγικά χαρακτηριστικά του *Cx. pipiens f. molestus*. Ειδικότερα, στην παρούσα έρευνα όταν έγιναν οι

συγκρίσεις μόνο για το *Cx. pipiens f. molestus* με και χωρίς γεύμα αίματος διαπιστώθηκε πως το γεύμα αίματος είχε σημαντική επίδραση στις δημογραφικές παραμέτρους (σε όλες εκτός από τον αριθμό των αρσενικών απογόνων). Οι τιμές ήταν υψηλότερες στα δημογραφικά χαρακτηριστικά του *Cx. pipiens f. molestus* χωρίς γεύμα αίματος σε σχέση με το γεύμα αίματος. Το συγκεκριμένο εύρημα πιθανώς οφείλεται σε φυσιολογικές διεργασίες που συμβαίνουν στο *Cx. pipiens f. molestus* με σκοπό την αυτογένεια ώστε και να αναπαράγεται σε πληθυσμούς που θα διατηρηθεί η επιβίωσή του στη φύση αλλά και η αναλογία του με το *Cx. pipiens f. pipiens* να είναι σχεδόν 1:1 ώστε να είναι ανταγωνιστικό. Σημαντική είναι η αναλογία αρσενικών/θηλυκών απογόνων που είναι κάτω από τη μονάδα και φέρνει σε σχετική ισορροπία την αναλογία με το *Cx. pipiens f. pipiens*. Η διατήρηση του πληθυσμού του *Cx. pipiens f. molestus* χωρίς γεύμα αίματος δείχνει γενετική προδιάθεση στην αυτογένεια που μειώνει τη μετάδοση μολυσματικών ασθενειών όπως ο ΙΔΝ στον άνθρωπο, γεγονός που αποτελεί φυσική δικλείδα προστασίας του ανθρώπου.

Οι Kassim και συν. (2012) μελέτησαν την αυτογένεια των θηλυκών του *Cx. pipiens f. molestus* με και χωρίς σύζευξη. Διαπιστώθηκε μείωση των ωών χωρίς σύζευξη από τα οποία κανένα δεν ήταν βιώσιμο. Όταν δόθηκαν πέντε διαφορετικές δίαιτες στο προνυμφικό στάδιο η ωοπαραγωγή κυμάνθηκε σχεδόν στα ίδια επίπεδα με την παρούσα έρευνα μόνο στην περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκε η δίαιτα με τη μεγαλύτερη ποσότητα τροφής.

Στην έρευνα των Kassim και συν. (2012) χρησιμοποιήθηκε δίαιτα με χαμηλή και υψηλή ποσότητα τροφής στο προνυμφικό στάδιο και υδατικό διάλυμα ζάχαρης ή νερό για τα ενήλικα. Σχηματίστηκαν οκτώ συνδυασμοί φύλου και διατροφής συσχετίζοντας την δίαιτα στο προνυμφικό στάδιο με τα φύλα και με το διάλυμα ζάχαρης ή το νερό για τα ενήλικα. Όταν δόθηκε υψηλή ποσότητα τροφής στο αρσενικό και στο θηλυκό στο προνυμφικό στάδιο και υδατικό διάλυμα ζάχαρης στο ενήλικο τα αποτελέσματα επαληθεύτηκαν με εκείνα της παρούσας έρευνας.

Οι Gao και συν. (2019) μελέτησαν την ωοπαραγωγή από ενήλικα θηλυκά του *Cx. pipiens f. molestus* και τα ευρήματα έρχονται σε αντίθεση με την

παρούσα έρευνα με τη διαφορά να αποδίδεται πιθανότατα στις διαφορετικές πειραματικές διαδικασίες και στην διαφορετική προσαρμογή του άγριου πληθυσμού στο μικρόκλιμα. Επιπλέον, στη έρευνα των Gao και συν. (2019) παρατηρείται μείωση της ωοπαραγωγής καθώς αυξάνονται οι γενεές και πιθανώς οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες.

Συχνά αναφέρεται η επίδραση της διατροφής στην περίοδο ανάπτυξης και στην γονιμότητα των ενήλικων κουνουπιών. Οι Wu και συν. (2014) αναφέρουν ότι το αυτογενές *Cx. pipiens* f. *molestus* αφού έλαβε γεύμα αίματος ωτόκησε μεγαλύτερες σχεδίες σε σχέση με τα θηλυκά που δεν τρέφονταν με αίμα. Τα ευρήματα της παρούσας έρευνας διαφέρουν σε σχέση με εκείνα των Wu και συν. (2014) καθώς στην ωοπαραγωγή με γεύμα αίματος παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά μειωμένη ωοπαραγωγή σε σχέση με την ωοπαραγωγή αυτογενώς. Η συγκεκριμένη διαφορά στην παραγωγή ωών μπορεί να αποδοθεί στη γενετική διαφορά που προκαλείται από τη γεωγραφική απομόνωση καθώς και από τη διατροφή των προνυμφών. Πιθανώς, η διατροφή των προνυμφών μπορεί να επηρεάσει το μέγεθος των αυτογενών σχεδιών ωών, καθώς και την έκφραση της αυτογένεσης (Clements, 1992; Kassim et al., 2012c,b; Lounibos et al., 1982).

Μελλοντική έρευνα θα μπορούσε να επεκταθεί με πολλαπλά γεύματα αίματος (τουλάχιστον δύο) σε εργαστηριακές και σε συνθήκες περιβάλλοντος τόσο με γεύμα αίματος αποκλειστικά από άνθρωπο όσο και με τον συνδυασμό γεύματος αίματος από θηλαστικό και άνθρωπο. Επίσης, τόσο σε επίπεδο εργαστηρίου όσο και σε συνθήκες περιβάλλοντος ενδιαφέρον θα είχαν τα πολλαπλά γεύματα αίματος προέρχονται από ανθρώπινο αίμα διαφορετικού τύπου. Τα συγκεκριμένα δεδομένα θα δώσουν χρήσιμες πληροφορίες για την ανάπτυξη μοντέλων προσδόκιμου ζωής καθώς και επιδημιολογικών μοντέλων μετάδοσης ασθενειών · στοιχεία χρήσιμα στα προγράμματα καταπολέμησης κουνουπιών. Τέλος θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθούν οι φυσιολογικές επιδράσεις του γεύματος αίματος στους δύο βιοτύπους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

8 ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ, ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ, ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ, ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΕΡΕΥΝΑΣ

Η παρούσα διατριβή παρήγαγε πλήθος στοιχείων σχετικά με τη μακροβιότητα, την αναπαραγωγή, την εκτροφή και τον ποιοτικό έλεγχο των κουνουπιών της Θεσσαλίας όπως είναι το *Culex pipiens* f. *pipiens*, το *Culex pipiens* f. *molestus* και το *Aedes albopictus*. Τα σημαντικότερα αποτελέσματα της διατριβής συνοψίζονται στο Διάγραμμα 1. Μέχρι τώρα ήταν γνωστές αρκετές διαφορές στη βιολογία των σημαντικότερων κουνουπιών της Θεσσαλίας όπως του *Cx. pipiens* και του *Ae. albopictus* και αρκετές μεταξύ των βιοτύπων του *Cx. pipiens* (*pipiens* και *molestus*), οι οποίες αφορούσαν κυρίως τις στρατηγικές διαχείμασης και την αυτογένεια. Τα αποτελέσματα μας φωτίζουν και άλλες πτυχές της βιολογίας των παραπάνω ειδών και αναδुकνείουν επιπλέον διαφορές που σχετίζονται με την επίδραση των γευμάτων αίματος στην παραγωγή απογόνων και στη μακροβιότητα όπως και στην επίδραση της σύζευξης στη μακροβιότητα. Για παράδειγμα, όπως σχολιάζεται παρακάτω η διαφορετική ανταπόκριση στη σύζευξη και στο γεύμα αίματος των δύο βιοτύπων του *Cx. pipiens* είναι εξαιρετικά ενδιαφέρουσα και χρήζει περαιτέρω έρευνας. Επιπλέον, για το *Ae. albopictus* μελετήθηκαν παράγοντες που επηρεάζουν την εκτροφή των προνυμφών όπως ο συνωστισμός και η ποσότητα τροφής καθώς και η ποιότητα μαζικά εκτρεφόμενων και στερωμένων αρσενικών που χρησιμοποιούνται σε προγράμματα καταπολέμησης με την εξαπόλυση στερωμένων εντόμων. Η βελτιστοποίηση της εκτροφής μαζικά αναπαραγώμενων εντόμων είναι σημαντική για την παραγωγή υψηλής ποιότητας εντόμων που μπορούν να ανταγωνιστούν τα άγρια μετά την εξαπόλυση τους στο πεδίο. Συνεπώς, τα στοιχεία της συγκεκριμένης ενότητας συμβάλουν στη βελτιστοποίηση της εκτροφής. Όμως επιπλέον, δίνουν και σημαντικά στοιχεία για την κατανόηση του ανταγωνισμού των προνυμφών του κουνουπιού τίγρης που όπως είναι γνωστό χρησιμοποιεί συχνά ανθρωπογενείς, μικρού μεγέθους εστίες

[217]

αναπαραγωγής. Η ποιότητα των μαζικά εκτρεφόμενων εντόμων επηρεάζεται από πλήθος παραγόντων που αφορούν πέρα από την εκτροφή των ανήλικων, όπως αναφέρεται παραπάνω, και τη μεταχείριση μετά τη στείρωση και πριν την εξαπόλυση. Η μεταφορά από τις μονάδες παραγωγής στο πεδίο προκαλεί καταπόνηση που μπορεί να έχει εξαιρετικά αρνητικές επιπτώσεις στα αρσενικά. Τα στοιχεία μας που αφορούν στην ποιότητα μαζικά εκτρεφόμενων αρσενικών του *Ae. albopictus* που παράγονται στην Ιταλία και αποστέλονται προς εξαπόλυση στην Ελλάδα και στο Μαυροβούνιο δείχνουν ότι μεγάλης διάρκειας μεταφορά έχει δραματική επίπτωση στη ποιότητα των αρσενικών. Οι μελέτες που αφορούσαν την εκτροφή και την ποιότητα των μαζικά εκτρεφόμενων και στείρωμένων αρσενικών έγιναν μόνο στο κουνούπι τίγρης καθώς η συγκεκριμένη τεχνολογία και μεθοδολογία (εξαπόλυση στείρωμένων εντόμων) είναι αρκετά ώριμη και βρίσκει αποδοχή σε όλο και περισσότερες χώρες της Ευρώπης αλλά και παγκοσμίως για το είδος αυτό. Η ανάπτυξη της μεθόδου και για το κοινό κουνούπι *Cx. pipiens* θα ήταν ιδιαίτερα σημαντική για να αναπτυχθούν επιπλέον εργαλεία για την αντιμετώπιση του συγκεκριμένου είδους.

Σχετικά με τους παράγοντες που επηρεάζουν τη διάρκεια ζωής και την αναπαραγωγή όπως είναι η σύζευξη, το γεύμα αίματος και τα πολλαπλά γεύματα αίματος διαπιστώθηκε πως έχουν διαφορετική επίδραση τόσο μεταξύ των διαφορετικών ειδών κουνουπιών όσο και μεταξύ των βιοτύπων του ίδιου είδους. Ειδικότερα, η σύζευξη στο *Cx. pipiens f. pipiens* δεν επηρεάζει τη μακροβιότητα ούτε των αρσενικών ούτε των θηλυκών σε αντίθεση με το *Cx. pipiens f. molestus* όπου και μειώνει τη μακροβιότητα και στα δύο φύλα. Αυτό πιθανώς να σχετίζεται με την επίδραση του σπέρματος και των συνοδών εκκριμάτων που εκλύονται από το αρσενικό στο θηλυκό κατά τη σύζευξη και την επίδρασή τους στην αρμοστικότητα του κάθε βιοτύπου. Σχετικά με το *Ae. albopictus* δεν παρατηρείται κάποια επίδραση στη μακροβιότητα ούτε των αρσενικών ούτε των θηλυκών, σε αντίθεση με την επίδραση της σύζευξης και κατά προέκταση του σπέρματος και των συνοδών εκκριμάτων στο συγγενικό *Aedes aegypti* όπου παρατηρήθηκε αύξηση της διάρκειας ζωής των θηλυκών.

Όσον αφορά στο ένα γεύμα αίματος αυτό μειώνει τη μακροβιότητα στο θηλυκό *Cx. pipiens f. pipiens* όπου και είναι απαραίτητο για την ωοπαραγωγή (αναυτογενές). Από τελεολογική σκοπιά αυτό πιθανώς συμβαίνει γιατί το

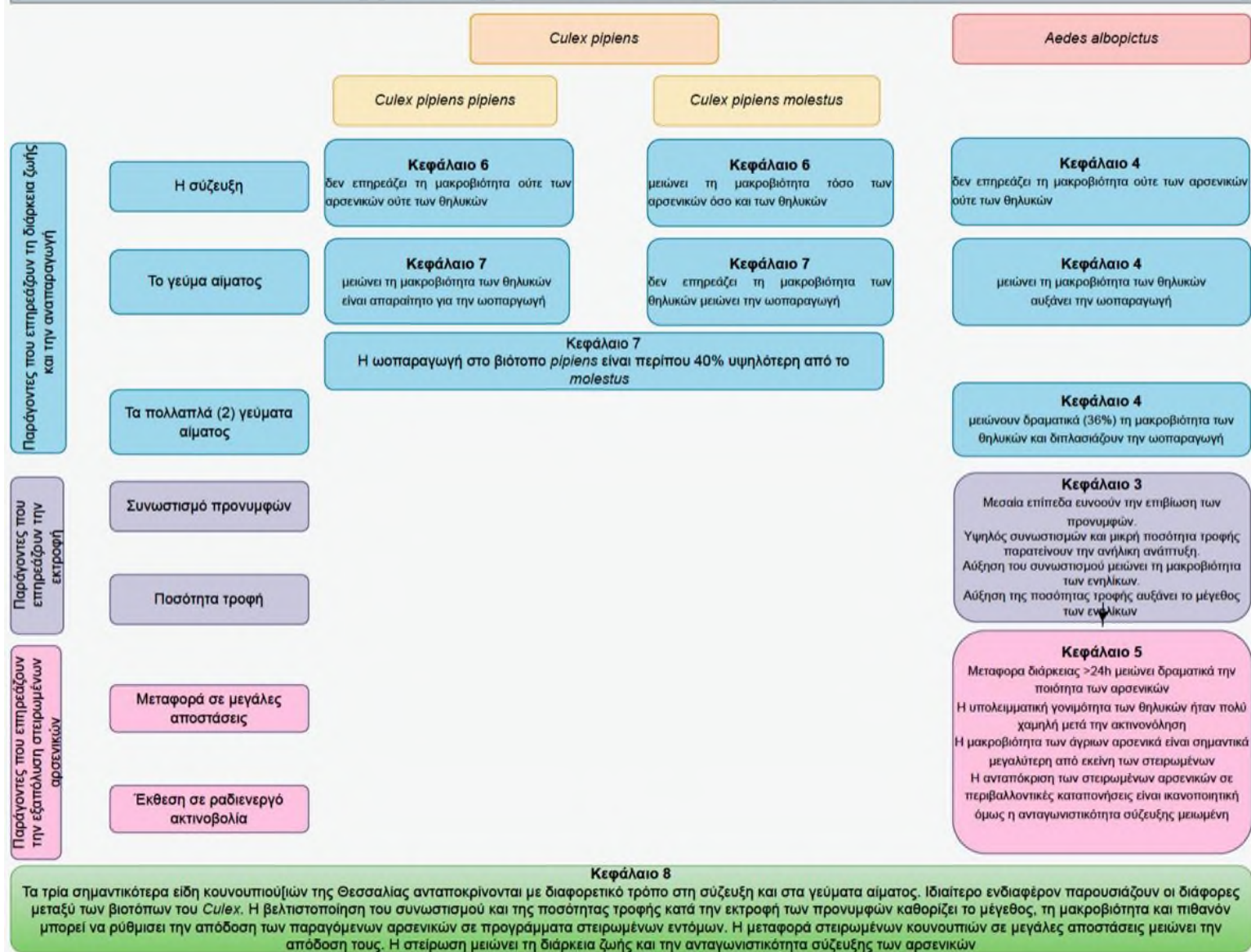
θηλυκό επιλέγει να «θυσιάσει» τη διάρκεια ζωής με σκοπό την παραγωγή απογόνων και τη διαιώνιση του είδους. Συνεπώς, εξαντλεί όλα τα ενεργειακά αποθέματα που είχε λάβει στο ανήλικο στάδιο και τα προϊόντα της πέψης του αίματος στην ωοπαραγωγή. Το κόστος αναπαραγωγής είναι καλά θεμελιωμένο στη βιολογία των εντόμων. Στο *Cx. pipiens* f. *molestus* το γεύμα αίματος δεν επηρεάζει τη μακροβιότητα των θηλυκών και μειώνει την ωοπαραγωγή όπως έδειξαν τα ευρήματά μας. Αυτό συμβαίνει πιθανώς γιατί το αίμα δεν είναι αναγκαίο για την παραγωγή της πρώτης συστάδας ωών (αυτογενές). Πιθανώς η αναπαραγωγική στρατηγική του βιοτύπου *molestus* περιλαμβάνει την «επένδυση» ενέργειας σε περισσότερους κύκλους αναπαραγωγής αλλά με μικρότερη παραγωγή απογόνων και διατήρηση της μακροβιότητας των θηλυκών. Σημειώνεται ότι στο βιότυπο *Cx. pipiens* f. *pipiens* η ωοπαραγωγή είναι 40% μεγαλύτερη σε σχέση με το βιότυπο *Cx. pipiens* f. *molestus*. Στο *Ae. albopictus* το γεύμα αίματος μειώνει τη μακροβιότητα των θηλυκών και αυξάνει την ωοπαραγωγή καθώς το γεύμα αίματος είναι απαραίτητο για την ωοτοκία. Προφανώς η πέψη του αίματος είναι μία απαιτητική διαδικασία που καταπονεί τα θηλυκά του *Cx. pipiens* f. *pipiens* και του *Ae. albopictus*. Η καταπόνηση του θηλυκού από την πέψη του αίματος υποστηρίζεται και από τη δραματική επίδραση των δύο γευμάτων αίματος στο κουνούπι τίγρης που μειώνουν περαιτέρω τη μακροβιότητα των θηλυκών. Τα πολλαπλά γεύματα αίματος μειώνουν δραματικά (36%) τη μακροβιότητα των θηλυκών και διπλασιάζουν την ωοπαραγωγή. Φαίνεται συνεπώς ότι μικρό τμήμα των προϊόντων της πέψης του γεύματος αίματος επενδύεται στη διατήρηση του σώματος ενώ το μεγαλύτερο κατευθύνεται στην κοστοβόρα παραγωγή ωών. Συνεπώς, μπορούμε να υποθέσουμε πως όλα τα ενεργειακά αποθέματα που είχε λάβει το κουνούπι στο στάδιο της προνύμφης έχουν επενδυθεί στη διάρκεια ζωής και στην ωοπαραγωγή στο πρώτο γεύμα αίματος. Συνεπώς, η έλλειψη αυτών μειώνει την αρμοστικότητα του θηλυκού και σε συνδιασμό με την ωοπαραγωγή για δεύτερη φορά ασκεί επιπλέον καταπόνηση που οδηγεί στην αύξηση της θνησιμότητας.

Σχετικά με την εκτροφή των προνυμφών στο *Ae. albopictus* αυτή επηρεάζεται από το συνωστισμό και την ποσότητα τροφής όπως βρήκαμε στην παρούσα μελέτη. Παρατηρήθηκε πως μεσαία επίπεδα συνωστισμού ευνοούν την επιβίωση των προνυμφών ενώ υψηλός συνωστισμός και μικρή ποσότητα

τροφής παρατείνουν την ανήλικη ανάπτυξη. Η επίδραση αυτών στα ενήλικα είναι πως η αύξηση του συνωστισμού μειώνει τη μακροβιότητα των ενηλίκων ενώ η αύξηση της τροφής αυξάνει το μέγεθός τους και αυτό έχει επίδραση στη μαζική εκτροφή τους.

Σχετικά με τους παράγοντες που επηρεάζουν την εξαπόλυση των στερωμένων αρσενικών βρέθηκε πως η μεταφορά διάρκειας >24h μειώνει δραματικά την ποιότητα των αρσενικών, η υπολειμματική γονιμότητα των θηλυκών ήταν πολύ μικρή μετά την ακτινοβολήση, η μακροβιότητα των άγριων αρσενικών είναι σημαντική μεγαλύτερη σε σχέση με τα στερωμένα και η απόκριση των στερωμένων αρσενικών σε περιβαλλοντική καταπόνηση είναι ικανοποιητική όμως η ανταγωνιστικότητα σύζευξης είναι μειωμένη. Ο ποιοτικός έλεγχος των στερωμένων αρσενικών έδειξε ικανοποιητικά αποτελέσματα, όμως χρειάζονται ακόμη ενέργειες ώστε να αυξηθεί η ποιότητα των παραγόμενων στερωμένων εντόμων ώστε να είναι περισσότερο ανταγωνιστικά με τα άγρια αρσενικά.

Βιολογία των σημαντικότερων κουνουπιών της Θεσσαλίας



Διάγραμμα 1. Βιολογία των σημαντικότερων κουνουπιών της Θεσσαλίας

Η σύνοψη των αποτελεσμάτων της διατριβής ανά πειραματική ενότητα δίνεται παρακάτω. Ορισμένες επαναλήψεις ήταν προφανώς αναπόφευκτες.

Στην πρώτη ενότητα πειραμάτων παρατηρήθηκε πως η αύξηση της τροφής αύξησε την επιβίωση των προνυμφών τόσο στο χαμηλό όσο και στο ενδιάμεσο επίπεδο συνωστισμού. Η επιβίωση των προνυμφών κορυφώθηκε και για τις δύο ποσότητες τροφής στο ενδιάμεσο επίπεδο συνωστισμού. Η διάρκεια ανάπτυξης των προνυμφών (χρόνος έως τη νύμφωση) μειώθηκε με την αύξηση του συνωστισμού και στα δύο επίπεδα τροφής. Η επιβίωση των νυμφών για τα 2 mg ποσότητα τροφής ήταν υψηλότερη στο μικρότερο επίπεδο

[221]

συνωστισμού ενώ η περίοδος ανάπτυξης τους αυξήθηκε στο υψηλότερο επίπεδο συνωστισμού. Στα ενήλικα, η μακροβιότητα των θηλυκών ήταν περίπου 30 ημέρες μεγαλύτερη σε σχέση με τα αρσενικά για την ίδια ποσότητα τροφής και για το ίδιο επίπεδο συνωστισμού. Τα θηλυκά ανεξαρτήτως συνωστισμού και τροφής είχαν μεγαλύτερο μέγεθος πτερύγων από τα αρσενικά. Στο ίδιο φύλο το μέγεθος των πτερύγων ήταν σημαντικά μεγαλύτερο στα 2 mg ανεξαρτήτου του επιπέδου συνωστισμού. Θα μπορούσαμε να εκμεταλλευτούμε το μέγεθος των θηλυκών προκειμένου να πετύχουμε μεγαλύτερη ωοπαραγωγή και συνεπώς περισσότερα αρσενικά με μικρότερο κόστος τα οποία θα μπορούσαμε να στείρουμε και να χρησιμοποιηθούν στα προγράμματα καταπολέμησης με την Τεχνική των Στείρων Ενόμων (SIT).

Στη δεύτερη ενότητα πειραμάτων βρέθηκε ότι η σύζευξη δεν επηρέασε τη διάρκεια ζωής ούτε στα αρσενικά ούτε στα θηλυκά του *Ae. albopictus*. Αντίθετα, τα γεύματα αίματος μείωσαν σημαντικά τη διάρκεια ζωής των θηλυκών. Ειδικότερα, τα δύο γεύματα αίματος μείωσαν κατά περίπου ένα μήνα τη διάρκεια ζωής σε σχέση με εκείνα που δεν έλαβαν γεύμα αίματος και κατά 20 ημέρες σε σχέση με εκείνα που έλαβαν ένα γεύμα αίματος. Όμως το δεύτερο γεύμα αίματος παρά το κόστος στη διάρκεια ζωής σχεδόν διπλασίασε την ωοπαραγωγή όπως και κατά συνέπεια και όλες τις παραμέτρους που σχετίζονται με αυτήν όπως είναι ο αριθμός των νυμφών ανά θηλυκό, το ποσοστό νύμφωσης των ωών και ο αριθμός των ενηλίκων απογόνων εκτός από την αναλογία φύλου που παρέμεινε σταθερή (1:1). Τα ευρήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη μοντέλων αύξησης των πληθυσμών των κουνουπιών τα οποία θα μπορούσαν να ενταχθούν σε επιδημιολογικά μοντέλα και σε στρατηγικής αντιμετώπισης.

Στην τρίτη ενότητα πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν ακτινοβολημένα αρσενικά από τρεις πληθυσμούς και βρέθηκε ότι και οι τρεις φυλές του εντόμου προκάλεσαν υψηλά επίπεδα στειρότητας στα θηλυκά. Όταν η μεταφορά των στειρωμένων αρσενικών διήρκεσε περισσότερο από 24 ώρες η θνησιμότητα τριπλασιάστηκε σε σχέση με μεταφορά διάρκειας μικρότερης από μία ημέρα. Η ικανότητα πτήσης των στειρωμένων αρσενικών μετά τον χρόνο μεταφοράς μιας ημέρας ήταν ικανοποιητική. Η απόκριση των στειρωμένων αρσενικών στην

έλλειψη τροφής και νερού ελαφρώς χαμηλότερη από αυτή των άγριων αρσενικών που δεν υποβλήθηκαν σε ακτινοβολία αλλά συγκρίσιμη, ενώ η μακροβιότητα των αρσενικών δεν επηρεάστηκε από τη σύζευξη αλλά ήταν μικρότερη σε σχέση με τον άγριο πληθυσμό. Τόσο η συχνότητα όσο και η ανταγωνιστικότητα σύζευξης με άγρια παρθένα θηλυκά ήταν υψηλότερη για τα άγρια αρσενικά σε σύγκριση με τα στερωμένα. Τα στερωμένα αρσενικά έζησαν πολύ λιγότερο (σχεδόν 2,5 φορές λιγότερο) από τα άγρια σε κανονικές συνθήκες τροφή και σε συνθήκες πίεσης (έλλειψη τροφής και νερού). Οι συζεύξεις των άγριων αρσενικών ήταν περισσότερες σε σχέση με τα στερωμένα. Συνολικά, η απόδοση των στερωμένων αρσενικών του *Ae. albopictus* που παραδόθηκε στην Ελλάδα από τις εγκαταστάσεις μαζικής εκτροφής της Ιταλίας σε περίπου 24 ώρες ήταν ικανοποιητική.

Η απόδοση των στερωμένων αρσενικών επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως είναι οι συνθήκες εκτροφής, η διαδικασία προσδιορισμού φύλου, η δόση και μέθοδος ακτινοβολίας καθώς και η συσκευασία μεταφοράς. Επίσης, η μεταφορά μπορεί να έχει αρνητική επίδραση στην ποιότητα του στερωμένου εντόμου και επηρεάζεται από την ψύξη και την πυκνότητα των εντόμων.

Στην τέταρτη ενότητα πειραμάτων βρέθηκε ότι η σύζευξη δεν επηρέασε τη μακροβιότητα ούτε των αρσενικών ούτε των θηλυκών του *Cx. pipiens* f. *pipiens*, όμως μείωσε τη διάρκεια ζωής τόσο των αρσενικών όσο και των θηλυκών του *Cx. pipiens* f. *molestus*. Κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες τόσο τα αρσενικά όσο και τα θηλυκά του *pipiens* ήταν μακροβιότερα από του *molestus*. Φαίνεται ότι η επιβίωση σε υπέργεια ενδιαιτήματα σε σχέση με τα προστατευμένα υπόγεια επιλέγει για μακρύτερη διάρκεια ζωής. Οι εποχικές μεταβολές στις περιβαλλοντικές συνθήκες και στη διαθεσιμότητα ξενιστών για λήψη αίματος πιθανόν συνδέονται με την επιλογή για μακρύτερη διάρκεια ζωής στο βιότυπο *pipiens* σε σχέση με το *molestus*. Συνεπώς, το προσδόκιμο ζωής μπορεί να σχετίζεται με την καταγωγή του κάθε βιοτύπου (υπόγεια ή υπέργεια) και τον βαθμό προσαρμογής του στις επικρατούσες κλιματολογικές συνθήκες. Το ότι η σύζευξη επηρεάζει τη μακροβιότητα του βιοτύπου *Cx. pipiens* f. *molestus* αλλά όχι του *Cx. pipiens* f. *pipiens* θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην διερεύνηση των επιδράσεων της σύζευξης στη βιολογία των κουνουπιών.

Καθώς το *Cx. pipiens* f. *pipiens* διαχειμάζει ως συζευγμένο μη αναπαραγωγικά ώριμο θηλυκών μπορεί να έχει αναπτύξει μηχανισμούς αντιμετώπισης των πιθανά «τοξικών» επιδράσεων της σύζευξης δεδομένης της μακράς διάρκειας ζωής των διαχειμαζόντων θηλυκών.

Στην πέμπτη ενότητα πειραμάτων η διάρκεια ζωής των θηλυκών του *Cx. pipiens* f. *pipiens* χωρίς γεύμα αίματος ήταν μακρύτερη σε σχέση με εκείνη με ένα γεύμα αίματος. Η διάρκεια ζωής των θηλυκών του *Cx. pipiens* f. *molestus* χωρίς γεύμα αίματος ήταν παραπλήσια σε σχέση με ένα γεύμα αίματος. Με ένα γεύμα αίματος η επιβίωση ήταν μεγαλύτερη στο *Cx. pipiens* f. *pipiens* σε σχέση με το *Cx. pipiens* f. *molestus*. Το γεύμα αίματος αύξησε την ωοπαραγωγή των θηλυκών του *Cx. pipiens* f. *pipiens* σε σχέση με εκείνη του *Cx. pipiens* f. *molestus* με αντίστοιχη επίδραση και στις παραγόμενες νύμφες και ενήλικες απογόνους. Στο *Cx. pipiens* f. *molestus* η ωοπαραγωγή χωρίς γεύμα αίματος ήταν αυξημένη σε σχέση με την ωοπαραγωγή με γεύμα αίματος με αντίστοιχη επίδραση και στις παραγόμενες νύμφες και ενήλικες απογόνους.

Η καταγωγή του *Cx. pipiens* f. *pipiens* είναι υπέργεια σε αντίθεση με εκείνη του *Cx. pipiens* f. *molestus*. Ακόμη και αν το *Cx. pipiens* f. *molestus* ενίσχυσε την παρουσία του υπέργεια, τα ευρήματα υποδηλώνουν πως δεν έχει προσαρμοστεί πλήρως στο «νέο» περιβάλλον. Φαίνεται πως το *Cx. pipiens* f. *pipiens* αξιοποιεί καλύτερα τις πρωτεΐνες που βρίσκονται στο αίμα σε σχέση με το *Cx. pipiens* f. *molestus* και επιμηκύνει την διάρκεια ζωής του θηλυκού και έχει περισσότερους γονοτροφικούς κύκλους με το μέγιστο αριθμό απογόνων. Αυτό συμβαίνει καθώς έχει περιορισμένο χρονικό διάστημα αναπαραγωγής και κατά συνέπεια ωοτοκίας καθώς οι περιβαλλοντικές συνθήκες υπαγορεύουν υποχρεωτική διάπαυση. Φαίνεται πως η διαφοροποίηση των βιολογικών χαρακτηριστικών του εντόμου συσχετίζεται με το είδος και τον βιότυπο. Ακόμη και αν βρίσκονται στο ίδιο περιβάλλον τα έντομα διατηρούν τα αρχέγονα γενετικά κληρονομούμενα βιολογικά χαρακτηριστικά τους και απλά συνυπάρχουν με τα υπόλοιπα είδη και τους βιοτύπους διατηρώντας τη μοναδικότητά τους.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής δείχνουν ότι διαφορετικά είδη κουνουπιών αλλά και βιότυποι του ίδιου είδους ακόμη και από την ίδια γεωγραφική περιοχή διαφέρουν κυρίως στη διάρκεια ζωής τους και στην

ωοπαραγωγή, παράγοντες που επηρεάζονται από το είδος του κουνουπιού, το φύλο, τη σύζευξη και τα γεύματα αίματος.

8.1 Προοπτικές περαιτέρω έρευνας

Η καταπολέμηση και η γενικότερη αντιμετώπιση του κάθε γένους κουνουπιού (*Culex*, *Aedes*, *Anopheles*) πρέπει να προσαρμόζεται στα διαφορετικά χαρακτηριστικά της της βιολογίας του. Για παράδειγμα, οι προνύμφες του *Ae. albopictus* βρίσκονται κυρίως σε μικρές εστίες νερού σε αστικές περιοχές, αφού τα ωά μεταφέρονται μηχανικά από τους ανθρώπους δια μέσω του εμπορίου. Επίσης, σχετικά με το *Cx. pipiens*, ο βιότοπος *Cx. pipiens* f. *pipiens* βρίσκεται κυρίως σε αγροτικές περιοχές καθώς τα ενήλικα εμφανίζουν ορνιθοφιλική προτίμηση ενώ ο βιότοπος *Cx. pipiens* f. *molestus* βρίσκεται κυρίως σε αστικές περιοχές και κατά προτίμηση σε υπόγεια μέρη εξαιτίας της καταγωγής του και της ανθρωπόφιλης προτίμησης των ενηλίκων του ως γεύμα αίματος.

Για μια αποτελεσματική καταπολέμηση βασικό στοιχείο είναι η ανάπτυξη πληθυσμιακών (Lequime et al., 2020) και επιδημιολογικών μοντέλων. Τα ήδη υπάρχοντα μοντέλα για τα είδη *Culex* και *Aedes* που συνδέονται με την αντιμετώπιση του του Ιού του Δυτικού Νείλου (Fasano et al., 2022) και του δάγγειο πυρετό (Otero & Solari) αντίστοιχα είναι κυρίως κλιματικά και δεν περιλαμβάνουν τα δημογραφικά στοιχεία αύξησης των πληθυσμών των κουνουπιών της προς μελέτης περιοχής. Τα μοντέλα μετάδοσης ασθενειών είναι ευαίσθητα σε αλλαγές στα δημογραφικά χαρακτηριστικά και στη μακροβιότητα των ενηλίκων, γεγονός που υποδηλώνει ότι ακόμη και μικρές αλλαγές στη μακροβιότητα των ενηλίκων που προκαλούνται από τον ανταγωνισμό των προνυμφών μπορεί να οδηγήσουν σε μεταβολές μετάδοσης των παθογόνων που προκαλούν μολυσματικές ασθένειες (Luz et al., 2003; Alto et al., 2008).

Συνεπώς η ανάπτυξη δημογραφικών πληθυσμιακών μοντέλων αξιοποιώντας τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής και άλλα δημοσιευμένα αποτελεί μια περιοχή μελλοντικής έρευνας με ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Τα μοντέλα αυτά πρέπει να λαμβάνουν υπόψιν τις ιδιαιτερότητες

της βιολογίας των βιοτύπων ιδιαίτερα για το *Culex*. Προφανώς, διαφορετικά μοντέλα πρέπει να αναπτυχθούν για το βιότυπο *riprens* και για το βιότυπο *molestus*.

Τα στοιχεία της παρούσας διατριβής δίνουν σημαντικές πληροφορίες για την εκτροφή των ανηλίκων του *Ae. albopictus* και για την ποιότητα των παραγόμενων στείρομένων αρσενικών. Η αξιοποίηση των αποτελεσμάτων μας στη μαζική εκτροφή αποτελεί μια σημαντική νέα προοπτική για την παραγωγή υψηλής ποιότητας εντόμων. Ήδη τα υπάρχει ενδιαφέρον για την μείωση του κόστους παραγωγής των στείρομένων εντόμων με παράλληλη διατήρηση ή αύξηση της ποιότητας των παραγόμενων εντόμων. Στις προσπάθειες αυτές η βελτιστοποίηση της παραγωγής του *Ae. albopictus* με τη λιγότερη ποσότητα τροφής και με την υψηλότερη μακροβιότητα και μέγεθος των αρσενικών ώστε να αυξηθεί η ανταγωνιστικότητά τους σε σχέση με τα άγρια αποτελεί προτεραιότητα.

Όπως είναι γνωστό οι δύο βιότυποι του *Culex* παράγουν υβρίδια που θεωρούνται μεγάλης επιδημιολογικής σημασίας (Gomes et al., 2013). Η δημογραφία των υβριδίων και η ανταπόκριση τους σε περιβαλλοντικές, διατροφικές και άλλες καταπονήσεις αποτελεί ένα ενδιαφέρον πεδίο έρευνας. Η ανάπτυξη πινάκων ζωής και γονιμότητας για τα υβρίδια και τους δύο βιοτύπους θα αποτελέσει σημαντικό στοιχείο για την ανάπτυξης ολοκληρωμένων πληθυσμιακών μοντέλων.

Τέλος, οι διαφορές στην ανταπόκριση στη σύζευξη και στα γεύματα αίματος μεταξύ των δύο βιοτύπων πρέπει να αξιοποιηθούν σε νέες μελέτες με στόχο την κατανόηση των μοριακών και άλλων φυσιολογικών μηχανισμών που ρυθμίζουν το κόστος αναπαραγωγής και την αποτελεσματικότητα της πέψης του αίματος και αξιοποίησης του στην παραγωγή συστάδων ωών.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Παράρτημα Ι

Πίνακας 1. Τα είδη των κουνουπιών της Ελλάδας

Υποοικογένεια Anophelinae	
• <i>Anopheles</i> (<i>Anopheles</i>)	
1. <i>An. algeriensis</i> Theobald 1903	35. <i>Oc. punctor</i> (Kirby) 1837
2. <i>An. atroparvus</i> Van Thiel 1927 (#)	36. <i>Oc. sticticus</i> (Meigen) 1838
3. <i>An. claviger</i> (Meigen) 1804	37. <i>Oc. zammitii</i> (Theobald) 1903
4. <i>An. hyrcanus</i> (Pallas) 1771	• <i>Ochlerotatus</i> (<i>Rusticoidus</i>)
5. <i>An. labbranchiae</i> Falleroni 1926	38. <i>Oc. lepidonotus</i> (Edwards) 1920
6. <i>An. maculipennis</i> Meigen 1818	39. <i>Oc. lefiki</i> (Medschid) 1928 (#)
7. <i>An. marteri marteri</i> Senevet & Prunelle 1927	40. <i>Oc. rusticus</i> (Rossi) 1970 (*)
<i>An. marteri sogdianus</i> Keshishian 1938	• <i>Coquillettidia</i> (<i>Coquillettidia</i>)
8. <i>An. melanoon</i> Hacket 1934	41. <i>Co. buxtoni</i> (Edwards) 1923 (#)
9. <i>An. messeae</i> Falleroni 1926 (*)	
10. <i>An. petraghiani</i> Del Vecchio 1939 (#)	42. <i>Co. richiardii</i> (Ficalbi) 1889
11. <i>An. plumbeus</i> Stephens 1828	• <i>Culex</i> (<i>barraudius</i>)
12. <i>An. pseudopictus</i> (Grassi) 1889	43. <i>Cx. modestus</i> Ficalbi 1889
13. <i>An. sacharovi</i> Favre 1903	44. <i>Cx. pusillus</i> Macquart 1850
14. <i>An. subalpinus</i> Hackett & Lewis 1935	• <i>Culex</i> (<i>Culex</i>)
• <i>Anopheles</i> (<i>Cellia</i>)	45. <i>Cx. laticinctus</i> Edwards 1913
15. <i>An. cinereus hispaniola</i> (Theobald) 1903 (*)	
16. <i>An. sergentii</i> (Theobald) 1907	46. <i>Cx. mimeticus</i> Noe 1899
17. <i>An. superpictus</i> Grassi 1889	47. <i>Cx. perexiguus</i> Theobald 1903
Υποοικογένεια Culicinae	48. <i>Cx. pipiens</i> Linnaeus 1758
<i>Aedes</i> (<i>Aedimorphus</i>)	49. <i>Cx. theileri</i> Theobald 1903
18. <i>Ae. vexans</i> (Meigen) 1830	50. <i>Cx. torrentium</i> Martini 1925 (#)
<i>Aedes</i> (<i>Stegomyia</i>)	51. <i>Cx. tritaeniorhynchus</i> Giles 1901
19. <i>Ae. aegypti</i> (Linnaeus) 1762	• <i>Culex</i> (<i>Maillitia</i>)
20. <i>Ae. albopictus</i> (Skuse) 1895	52. <i>Cx. hortensis</i> Ficalbi 1889
21. <i>Ae. cretinus</i> Edwards 1921	• <i>Culex</i> (<i>Neoculex</i>)
<i>Ochlerotatus</i> (<i>Finlaya</i>)	53. <i>Cx. impudicus</i> Ficalbi 1890 (#)
22. <i>Oc. echinus</i> Edwards 1920	54. <i>Cx. martinii</i> Medschid 1930 (#)

23. *Oc. geniculatus* (Olivier) 1791

55. *Cx. territans* Walker 1856

Ochlerotatus (*Ochlerotatus*)

24. *Oc. annulipes* (Meigen) 1830

25. *Oc. berlandi* (Seguy) 1921

26. *Oc. cantans* (Meigen) 1818 #

27. *Oc. caspius* (Pallas) 1771

28. *Oc. catafylla* (Dyar) 1916

29. *Oc. communis* (De Geer) 1776

30. *Oc. detritus* (Haliday) 1833

31. *Oc. dorsalis* (Meigen) 1830

32. *Oc. mariae* (Sergent & Sergent) 1903

33. *Oc. pulcritarsis* (Rondani) 1872

34. *Oc. pullatus* (Coquillett) 1904

• *Culiseta* (*Allotheobaldia*)

56. *Cs. longiareolata* (Macquat) 1838

• *Culiseta* (*Culicella*)

57. *Cs. fumipennis* (Stephens) 1825

58. *Cs. morsitans* (Theobald) 1901

• *Culiseta* (*Culiseta*)

59. *Cs. annulata* (Schrank) 1776

60. *Cs. glaphyoptera* (Schiner) 1864 (#)

61. *Cs. subochrea* (Edwards) 1921

• *Orthopodomyia*

62. *Or. pulcripalpis* (Rondani) 1872

• *Uranotaenia*

63. *Ur. unguiculata* Edwards 1913

Σύμφωνα με τον κατάλογο στα είδη που υπάρχει (*) αναφέρονται ως ελληνικά από τους Pantazis (1935) και Shannon (1935) ενώ αυτά που σημειώνονται με (#) πρέπει να υπάρχουν στην Ελλάδα με βιβλιογραφικές αναφορές για την γεωγραφική τους πηγή. Πρόσφατα έχουν αναφερθεί στην Ελλάδα και τα είδη *Oc. rusticus* (Λύτρα και συνεργάτες, 2011) και *Cx. impudicus* (Kioulos et al., 2014).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

Διάρκεια ανάπτυξης προνυμφών

Όσον αφορά τις διαφορές στα επίπεδα συνωστισμού προέκυψαν τα εξής: Για ποσότητα τροφής 1mg η επιβίωση διέφερε στατιστικά σημαντικά σε διάφορα επίπεδα συνωστισμού ($F(2,227)=21,944$, $p<0,001$). Πιο συγκεκριμένα η ομάδα με συνωστισμό 100 νύμφες/1lt νερού είχε σημαντικά υψηλότερη επιβίωση από την ομάδα με 300 προνύμφες/1lt νερού ($p=0,01$). Επίσης, η ομάδα με συνωστισμό 300 νύμφες/1lt νερού είχε σημαντικά μικρότερη επιβίωση από την ομάδα με 600 προνύμφες/1lt ($p<0,001$). Για ποσότητα τροφής 2mg η επιβίωση δε διέφερε στατιστικά σημαντικά σε όλα τα επίπεδα συνωστισμού ($F(2,2020)=5,359$, $p<0,005$). Πιο συγκεκριμένα η ομάδα με συνωστισμό 300 νύμφες/1lt νερού είχε σημαντικά μικρότερη επιβίωση από την ομάδα με 600 νύμφες/1lt ($p=0,003$).

Μακροβιότητα και μέγεθος ενηλίκων

Όσον αφορά τις διαφορές στα επίπεδα συνωστισμού προέκυψαν τα εξής: Στα αρσενικά για ποσότητα τροφής 2mg η επιβίωση διέφερε στατιστικά σημαντικά σε διάφορα επίπεδα συνωστισμού ($F(2,117)=10,254$, $p<0,001$). Πιο συγκεκριμένα η ομάδα με συνωστισμό 100 προνύμφες/1lt νερού είχε σημαντικά υψηλότερη επιβίωση από την ομάδα με 300 προνύμφες/1lt νερού ($p<0,001$) καθώς και από εκείνη με 600 προνύμφες/1lt νερού ($p<0,001$) ενώ και η ομάδα με συνωστισμό 300 προνύμφες/1lt νερού δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά από την ομάδα με 600 προνύμφες/1lt ($p=1,000$).

Μέγεθος πτερύγων

Όσον αφορά τις διαφορές στα επίπεδα συνωστισμού προέκυψαν τα εξής: Στα θηλυκά για ποσότητα τροφής 1mg το μέγεθος των πτερύγων διέφερε στατιστικά σημαντικά σε διάφορα επίπεδα συνωστισμού ($F(2,84)=4,759$, $p=0,11$). Πιο συγκεκριμένα η ομάδα με συνωστισμό 300 προνύμφες/1lt νερού είχε σημαντικά υψηλότερη μεγαλύτερο μέγεθος πτερύγων από την ομάδα με 600 προνύμφες/1lt νερού ($p=0,008$).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

Πίνακας 1. Επίδραση του συνωστισμού προνυμφών και η επάρκεια τροφής στη βιολογία των ενηλίκων

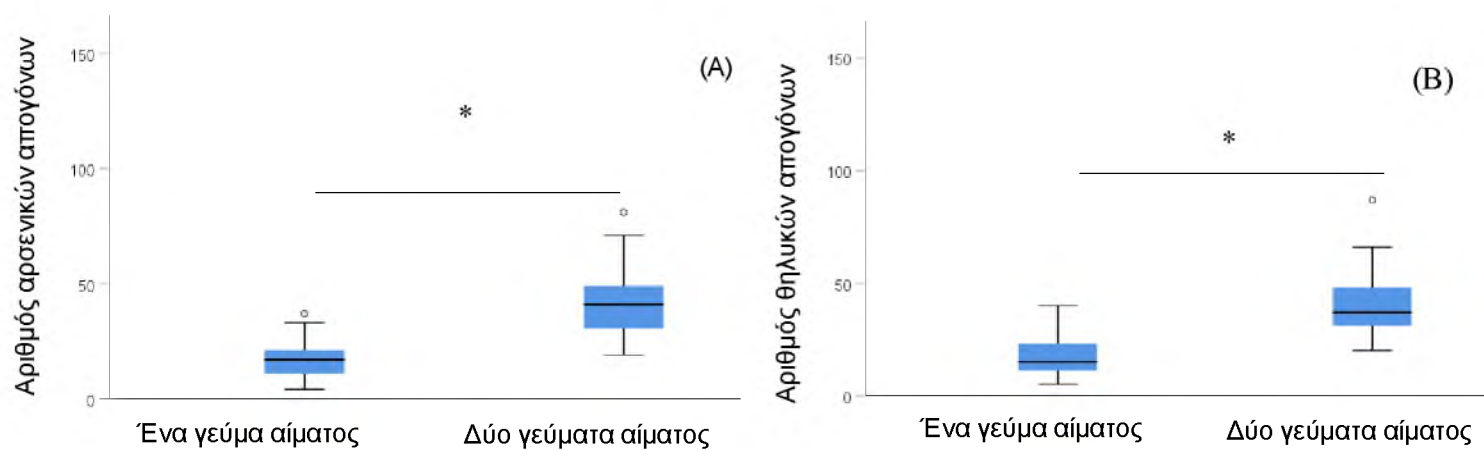
Τα θηλυκά είχαν σημαντικά μεγαλύτερη διάρκεια ζωής από τα αρσενικά στο ίδιο επίπεδο συνωστισμού και την ίδια δόση τροφής ($p < 0,001$).

Συνωστισμός προνυμφών	Ποσότητα τροφής (mg)	Φύλο	N	M.T	T.A	p
100	2	Θηλυκό	40	84,63	20,53	<0,001
		Αρσενικό	40	52,35	20,12	
	1	Θηλυκό	40	86,40	21,91	<0,001
		Αρσενικό	40	48,73	16,64	
300	2	Θηλυκό	40	80,75	18,58	<0,001
		Αρσενικό	40	37,15	15,44	
	1	Θηλυκό	40	74,60	27,22	<0,001
		Αρσενικό	40	47,03	22,89	
600	2	Θηλυκό	40	72,95	26,17	<0,001
		Αρσενικό	40	37,75	14,95	
	1	Θηλυκό	40	76,78	24,63	<0,001
		Αρσενικό	40	43,68	17,93	

M.T.: Μέση τιμή

T.A.: Τυπική απόκλιση

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV



Διάγραμμα 1 Επίδραση του αριθμού γευμάτων αίματος (ένα ή δύο) στον αριθμό των αρσενικών (A) και θηλυκών απογόνων (B). Το (*) δείχνει σημαντική διαφορά ($p < 0,05$, Διάγραμμα 1)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V

Πίνακας 1 Πίνακας επιβίωσης παρθένων αρσενικών ενηλίκων του *Culex pipiens f. pipiens*.

Παρθένα αρσενικά του <i>Culex pipiens f. pipiens</i>						
Ηλικία (x)	Αριθμός ζώντων (Nx)	Επιβίωση (lx)	Πιθανότητα επιβίωσης (px)	Πιθανότητα θανάτου (qx)	Συχνότητα θανάτων (dx)	Προσδόκιμο ζωής (ημέρες) (ex)
0	43,00	1,00	1,00	0,00	0,00	81,77
5	43,00	1,00	1,00	0,00	0,00	76,77
10	43,00	1,00	1,00	0,00	0,00	71,77
15	43,00	1,00	1,00	0,00	0,00	66,77
20	43,00	1,00	1,00	0,00	0,00	61,77
25	43,00	1,00	1,00	0,00	0,00	56,77
30	41,00	0,95	1,00	0,00	0,00	54,68
35	41,00	0,95	1,00	0,00	0,00	49,68
40	40,00	0,93	1,00	0,00	0,00	45,72
45	40,00	0,93	1,00	0,00	0,00	40,72
50	39,00	0,88	1,00	0,00	0,00	37,82
55	38,00	0,88	1,00	0,00	0,00	32,82
60	38,00	0,88	0,98	0,02	0,02	27,82
65	36,00	0,84	0,96	0,04	0,03	24,10
70	33,00	0,77	0,96	0,04	0,03	21,19
75	31,00	0,72	0,97	0,03	0,02	17,54
80	26,00	0,60	0,93	0,07	0,04	15,67
85	21,00	0,44	1,00	0,00	0,00	15,48
90	15,00	0,30	1,00	0,00	0,00	16,20
95	10,00	0,23	0,91	0,09	0,02	15,37
100	9,00	0,19	0,84	0,16	0,03	13,08
105	5,00	0,12	0,75	0,25	0,03	14,92
110	4,00	0,09	1,00	0,00	0,00	14,72
115	4,00	0,07	1,00	0,00	0,00	12,64

120	3,00	0,07	0,71	0,29	0,02	7,64
125	2,00	0,05	1,00	0,00	0,00	5,50
130	1,00	0,02	1,00	0,00	0,00	6,50
135	1,00	0,02	1,00	0,00	0,00	1,50
136	1,00	0,02	0,00	1,00	0,02	0,50
137	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00

Πίνακας 2 Πίνακας επιβίωσης συζευγμένων αρσενικών ενηλίκων του *Culex pipiens f. pipiens*

Συζευγμένα αρσενικά του <i>Culex pipiens f. pipiens</i>						
Ηλικία (x)	Αριθμός ζώντων (Nx)	Επιβίωση (lx)	Πιθανότητα επιβίωσης (px)	Πιθανότητα θανάτου (qx)	Συχνότητα θανάτων (dx)	Προσδόκιμο ζωής (ημέρες) (ex)
0	48,00	1,00	1,00	0,00	0,00	93,19
5	48,00	1,00	1,00	0,00	0,00	88,19
10	48,00	1,00	1,00	0,00	0,00	83,19
15	48,00	1,00	1,00	0,00	0,00	78,19
20	48,00	1,00	1,00	0,00	0,00	73,19
25	48,00	1,00	1,00	0,00	0,00	68,19
30	48,00	1,00	1,00	0,00	0,00	63,19
35	48,00	1,00	1,00	0,00	0,00	58,19
40	48,00	1,00	1,00	0,00	0,00	53,19
45	48,00	1,00	1,00	0,00	0,00	48,19
50	48,00	1,00	1,00	0,00	0,00	43,19
55	48,00	1,00	1,00	0,00	0,00	38,19
60	48,00	1,00	1,00	0,00	0,00	33,19
65	46,00	0,94	1,00	0,00	0,00	30,06
70	45,00	0,92	1,00	0,00	0,00	25,62
75	42,00	0,83	0,98	0,02	0,02	23,01
80	35,00	0,73	0,95	0,05	0,04	20,82
85	32,00	0,67	0,97	0,03	0,02	17,60
90	27,00	0,56	0,96	0,04	0,02	15,70
95	22,00	0,46	1,00	0,00	0,00	13,70
100	17,00	0,29	1,00	0,00	0,00	14,81
105	14,00	0,29	0,93	0,07	0,02	9,81
110	12,00	0,25	0,84	0,16	0,04	6,14
115	5,00	0,08	1,00	0,00	0,00	9,50
120	3,00	0,06	1,00	0,00	0,00	7,17
125	2,00	0,02	1,00	0,00	0,00	8,50
130	1,00	0,02	1,00	0,00	0,00	3,50

134	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00
-----	------	------	------	------	------	------

Πίνακας 3 Πίνακας επιβίωσης παρθένων θηλυκών ενηλίκων του *Culex pipiens f. pipiens*

Παρθένα θηλυκά του <i>Culex pipiens f. pipiens</i>						
Ηλικία (x)	Αριθμός ζώντων (Nx)	Επιβίωση (lx)	Πιθανότητα επιβίωσης (px)	Πιθανότητα θανάτου (qx)	Συχνότητα θανάτων (dx)	Προσδόκιμο ζωής (ημέρες) (ex)
0	50,00	1,00	1,00	0,00	0,00	63,92
5	50,00	1,00	1,00	0,00	0,00	58,92
10	50,00	1,00	1,00	0,00	0,00	53,92
15	49,00	0,98	1,00	0,00	0,00	49,99
20	49,00	0,98	1,00	0,00	0,00	44,99
25	49,00	0,98	1,00	0,00	0,00	39,99
30	48,00	0,96	0,98	0,02	0,02	35,75
35	47,00	0,94	1,00	0,00	0,00	31,50
40	47,00	0,94	0,98	0,02	0,02	26,50
45	46,00	0,92	0,96	0,04	0,04	22,07
50	43,00	0,86	0,98	0,02	0,02	18,50
55	37,00	0,74	0,97	0,03	0,02	16,20
60	34,00	0,62	1,00	0,00	0,00	13,66
65	30,00	0,46	0,96	0,04	0,02	11,98
70	18,00	0,36	0,89	0,11	0,04	9,94
75	14,00	0,26	1,00	0,00	0,00	7,96
80	11,00	0,20	0,50	0,50	0,10	4,50
85	4,00	0,08	1,00	0,00	0,00	5,00
90	3,00	0,02	1,00	0,00	0,00	2,50
93	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00

Πίνακας 4 Πίνακας επιβίωσης συζευγμένων θηλυκών ενηλίκων του *Culex ripiens* f. *ripiens*

Συζευγμένα θηλυκά του <i>Culex ripiens</i> f. <i>ripiens</i>						
Ηλικία (x)	Αριθμός ζώντων (Nx)	Επιβίωση (lx)	Πιθανότητα επιβίωσης (px)	Πιθανότητα θανάτου (qx)	Συχνότητα θανάτων (dx)	Προσδόκιμο ζωής (ημέρες) (ex)
0	47,00	1,00	1,00	0,00	0,00	65,03
5	47,00	1,00	1,00	0,00	0,00	60,03
10	47,00	1,00	1,00	0,00	0,00	55,03
15	47,00	1,00	1,00	0,00	0,00	50,03
20	47,00	1,00	1,00	0,00	0,00	45,03
25	47,00	1,00	1,00	0,00	0,00	40,03
30	47,00	1,00	1,00	0,00	0,00	35,03
35	47,00	1,00	1,00	0,00	0,00	30,03
40	46,00	0,98	1,00	0,00	0,00	25,57
45	45,00	0,94	1,00	0,00	0,00	21,53
50	44,00	0,94	0,93	0,07	0,07	16,53
55	40,00	0,81	1,00	0,00	0,00	13,88
60	26,00	0,55	1,00	0,00	0,00	14,06
65	24,00	0,36	0,94	0,06	0,02	14,22
70	16,00	0,34	1,00	0,00	0,00	10,03
75	11,00	0,21	0,90	0,10	0,02	9,88
80	7,00	0,15	0,60	0,40	0,06	7,83
85	4,00	0,06	1,00	0,00	0,00	11,83
90	2,00	0,04	1,00	0,00	0,00	12,00
95	2,00	0,04	1,00	0,00	0,00	7,00
100	1,00	0,02	1,00	0,00	0,00	6,50
105	1,00	0,02	1,00	0,00	0,00	1,50
106	1,00	0,02	0,00	1,00	0,02	0,50

Πίνακας 5 Πίνακας επιβίωσης παρθένων αρσενικών ενηλίκων του *Culex pipiens f. molestus*

Παρθένα αρσενικά του <i>Culex pipiens f. molestus</i>						
Ηλικία (x)	Αριθμός ζώντων (Nx)	Επιβίωση (lx)	Πιθανότητα επιβίωσης (px)	Πιθανότητα θανάτου (qx)	Συχνότητα θανάτων (dx)	Προσδόκιμο ζωής (ημέρες) (ex)
0	50,00	1,00	1,00	0,00	0,00	55,80
5	50,00	1,00	1,00	0,00	0,00	50,80
10	50,00	1,00	1,00	0,00	0,00	45,80
15	50,00	1,00	1,00	0,00	0,00	40,80
20	50,00	1,00	1,00	0,00	0,00	35,80
25	48,00	0,96	1,00	0,00	0,00	32,19
30	47,00	0,94	1,00	0,00	0,00	27,82
35	47,00	0,94	1,00	0,00	0,00	22,82
40	46,00	0,90	1,00	0,00	0,00	18,66
45	44,00	0,86	1,00	0,00	0,00	14,38
50	42,00	0,84	0,90	0,10	0,08	9,69
55	29,00	0,54	0,96	0,04	0,02	8,91
60	20,00	0,36	0,89	0,11	0,04	7,06
65	12,00	0,22	0,73	0,27	0,06	5,32
70	5,00	0,10	0,80	0,20	0,02	4,90
75	2,00	0,04	1,00	0,00	0,00	5,00
80	2,00	0,02	0,00	1,00	0,02	0,50
81	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00

Πίνακας 6 Πίνακας επιβίωσης συζευγμένων αρσενικών ενηλίκων του *Culex pipiens f. molestus*

Συζευγμένα αρσενικά του <i>Culex pipiens f. molestus</i>						
Ηλικία (x)	Αριθμός ζώντων (Nx)	Επιβίωση (lx)	Πιθανότητα επιβίωσης (px)	Πιθανότητα θανάτου (qx)	Συχνότητα θανάτων (dx)	Προσδόκιμο ζωής (ημέρες) (ex)
0	50,00	1,00	1,00	0,00	0,00	65,24
5	50,00	1,00	1,00	0,00	0,00	60,24
10	50,00	1,00	1,00	0,00	0,00	55,24
15	50,00	1,00	1,00	0,00	0,00	50,24
20	50,00	1,00	1,00	0,00	0,00	45,26
25	49,00	0,98	1,00	0,00	0,00	41,27
30	39,00	0,94	1,03	-0,03	-0,03	37,68
35	29,00	0,83	1,11	-0,11	-0,09	37,28
40	21,00	0,85	1,11	-0,11	-0,09	30,81
45	11,00	0,91	0,88	0,12	0,11	23,87
50	4,00	0,50	2,00	-1,00	-0,50	35,50
55	2,00	1,00	1,00	0,00	0,00	13,50
60	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	8,50
65	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	3,50
70	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00

Πίνακας 7 Πίνακας επιβίωσης παρθένων θηλυκών ενηλίκων του *Culex pipiens f. molestus*

Παρθένα θηλυκά του <i>Culex pipiens f. molestus</i>						
Ηλικία (x)	Αριθμός ζώντων (Nx)	Επιβίωση (lx)	Πιθανότητα επιβίωσης (px)	Πιθανότητα θανάτου (qx)	Συχνότητα θανάτων (dx)	Προσδόκιμο ζωής (ημέρες) (ex)
0	50,00	1,00	1,00	0,00	0,00	50,70
5	50,00	1,00	1,00	0,00	0,00	45,70
10	50,00	1,00	1,00	0,00	0,00	40,70
15	50,00	1,00	1,00	0,00	0,00	35,70
20	49,00	0,98	1,00	0,00	0,00	31,36
25	48,00	0,96	1,00	0,00	0,00	26,94
30	47,00	0,94	1,00	0,00	0,00	22,44
35	47,00	0,94	1,00	0,00	0,00	17,44
40	45,00	0,88	0,98	0,02	0,02	13,36
45	40,00	0,80	0,98	0,03	0,02	9,50
50	32,00	0,56	0,93	0,07	0,04	7,29
55	19,00	0,28	0,86	0,14	0,04	6,57
60	8,00	0,14	1,00	0,00	0,00	5,93
65	5,00	0,10	0,60	0,40	0,04	2,70
70	1,00	0,02	0,00	1,00	0,02	0,50
71	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00

Πίνακας 8 Πίνακας επιβίωσης συζευγμένων θηλυκών ενηλίκων του *Culex pipiens f. molestus*

Συζευγμένα θηλυκά του <i>Culex pipiens f. molestus</i>						
Ηλικία (x)	Αριθμός ζώντων (Nx)	Επιβίωση (lx)	Πιθανότητα επιβίωσης (px)	Πιθανότητα θανάτου (qx)	Συχνότητα θανάτων (dx)	Προσδόκιμο ζωής (ημέρες) (ex)
0	50,00	1,00	1,00	0,00	0,00	44,74
5	50,00	1,00	1,00	0,00	0,00	39,74
10	50,00	1,00	1,00	0,00	0,00	34,74
15	50,00	1,00	1,00	0,00	0,00	29,74
20	50,00	1,00	1,00	0,00	0,00	24,74
25	49,00	0,94	1,00	0,00	0,00	21,05
30	46,00	0,92	1,00	0,00	0,00	16,48
35	45,00	0,90	0,91	0,09	0,08	11,77
40	37,00	0,70	0,86	0,14	0,10	9,41
45	26,00	0,44	1,00	0,00	0,00	8,55
50	16,00	0,28	0,93	0,07	0,02	6,79
55	10,00	0,16	0,75	0,25	0,04	4,75
60	2,00	0,04	1,00	0,00	0,00	8,50
65	2,00	0,04	1,00	0,00	0,00	3,50
70	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00

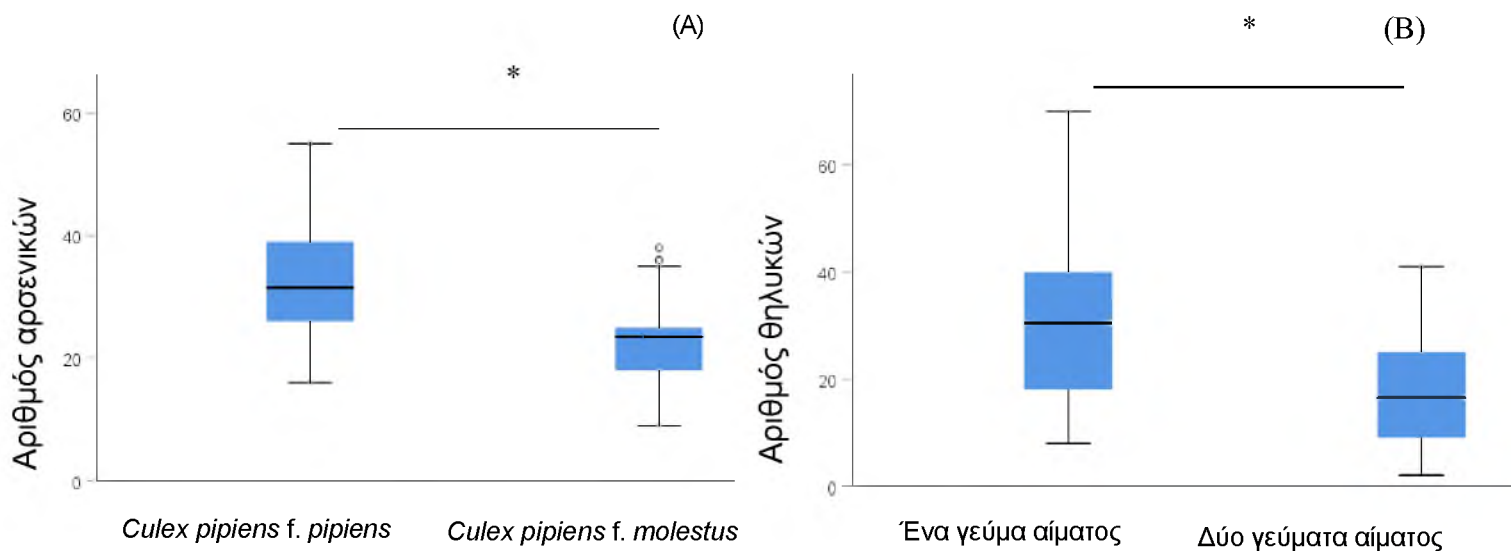
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI

Πίνακας 1 Πίνακας επιβίωσης ενηλίκων θηλυκών του *Culex ripiens* f. *ripiens* με γεύμα αίματος

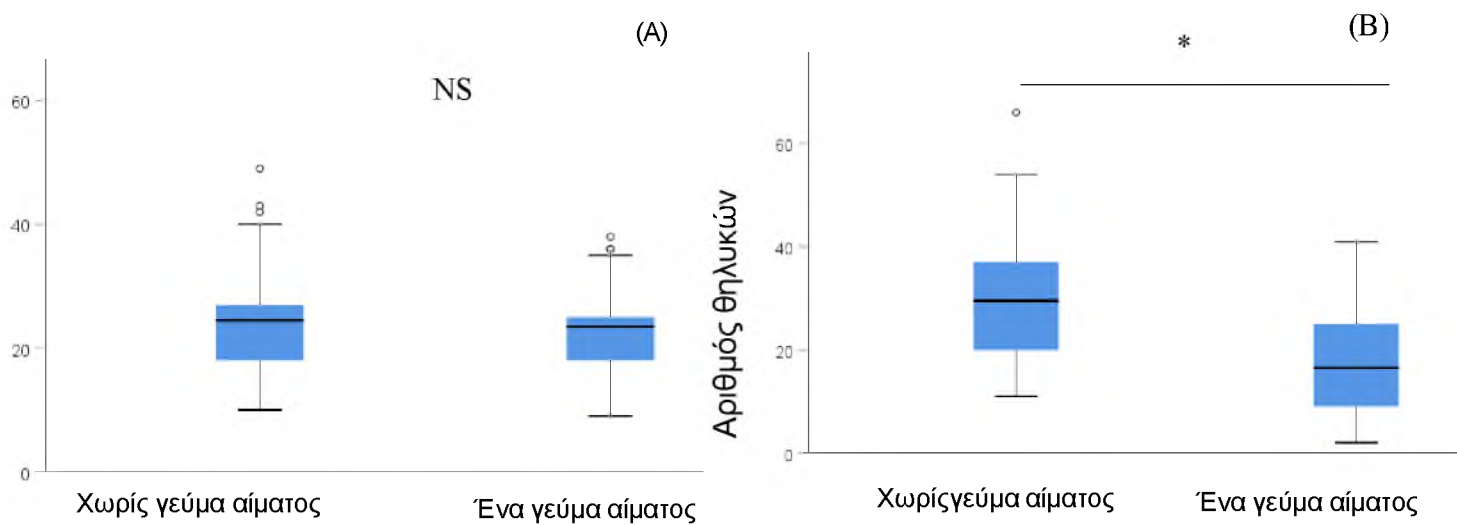
Θηλυκά του <i>Culex ripiens</i> f. <i>ripiens</i> με γεύμα αίματος						
Ηλικία (x)	Αριθμός ζώντων (Nx)	Επιβίωση (lx)	Πιθανότητα επιβίωσης (px)	Πιθανότητα θανάτου (qx)	Συχνότητα θανάτων (dx)	Προσδόκιμο ζωής (ημέρες) (ex)
0	52,00	1,00	1,00	0,00	0,00	56,98
5	52,00	1,00	1,00	0,00	0,00	51,98
10	52,00	1,00	1,00	0,00	0,00	46,98
15	52,00	1,00	1,00	0,00	0,00	41,98
20	52,00	1,00	1,00	0,00	0,00	36,98
25	52,00	1,00	1,00	0,00	0,00	31,98
30	52,00	1,00	1,00	0,00	0,00	26,98
35	48,00	0,92	1,00	0,00	0,00	24,11
40	44,00	0,85	1,00	0,00	0,00	20,85
45	43,00	0,81	0,98	0,02	0,06	16,69
50	37,00	0,71	1,00	0,00	0,02	13,88
55	33,00	0,63	1,00	0,00	0,03	10,42
60	27,00	0,48	0,93	0,07	0,08	7,77
65	15,00	0,27	0,93	0,07	0,00	7,28
70	10,00	0,15	0,80	0,20	0,02	5,43
75	4,00	0,08	1,00	0,00	0,02	3,50
80	1,00	0,02	1,00	0,00	0,00	1,50
81	1,00	0,02	1,00	0,00	0,02	0,50
82	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00

Πίνακας 2 Πίνακας επιβίωσης ενηλίκων θηλυκών του *Culex pipiens f. molestus* με γεύμα αίματος

Θηλυκά του <i>Culex pipiens f. molestus</i> με γεύμα αίματος						
Ηλικία (x)	Αριθμός ζώντων (Nx)	Επιβίωση (lx)	Πιθανότητα επιβίωσης (px)	Πιθανότητα θανάτου (qx)	Συχνότητα θανάτων (dx)	Προσδόκιμο ζωής (ημέρες) (ex)
0	38,00	1,00	1,00	0,00	0,00	44,26
5	38,00	1,00	1,00	0,00	0,00	39,26
10	38,00	1,00	1,00	0,00	0,00	34,26
15	38,00	1,00	1,00	0,00	0,00	29,26
20	38,00	1,00	1,00	0,00	0,00	24,26
25	38,00	0,89	0,89	0,11	0,05	21,70
30	29,00	0,74	0,97	0,03	0,00	20,64
35	24,00	0,63	1,00	0,00	0,02	18,80
40	23,00	0,58	0,96	0,04	0,03	15,17
45	20,00	0,50	0,95	0,05	0,05	12,24
50	16,00	0,42	1,00	0,00	0,03	9,33
55	11,00	0,29	1,00	0,00	0,03	7,67
60	8,00	0,21	1,00	0,00	0,03	4,79
65	5,00	0,11	0,80	0,20	0,00	2,23
68	2,00	0,03	0,50	0,50	0,03	0,50
69	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00



Διάγραμμα 1 Επίδραση του γεύματος αίματος στον αριθμό των αρσενικών (Α) και θηλυκών απογόνων (Β). Το (*) δείχνει σημαντική διαφορά ($p < 0,05$, Διάγραμμα 1) (Βλ. Παράρτημα VI)



NS: Non Significant

Διάγραμμα 2 Επίδραση του γεύματος αίματος στον αριθμό των αρσενικών (Α) και θηλυκών απογόνων (Β) με και χωρίς γεύμα αίματος. Το (*) δείχνει σημαντική διαφορά ($p < 0,05$, Διάγραμμα 1) (Βλ. Παράρτημα VI)

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

A

Abbo, S.R., Visser, T.M., Koenraadt, C.J.M., Pijlman, G.P., & Wang, H. (2021) Effect of blood source on vector competence of *Culex pipiens* biotypes for Usutu virus. *Parasites & Vectors*, 14, 194.

Abbott, W.S. (1987) A Method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of American Mosquito Control Association*, 3, 302–303.

Abd-Alla, A. M. M., Bergoin, M., Parker, A. G., Maniania, N. K., Vlak, J. M., Bourtzis, K., Boucias, D. G., & Aksoy, S. (2013). Improving Sterile Insect Technique (SIT) for tsetse flies through research on their symbionts and pathogens. *Journal of Invertebrate Pathology*, 112, 2–10.

Abramides, G.C., Roiz, D., Guitart, R., Quintana, S., & Gimenez, N. (2013) Control of the Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*) in a firmly established area in Spain: risk factors and people's involvement. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 107, 706–714.

Ader, D.B., Celluzzi, C., Bisbing, J., Gilmore, L., Gunther, V., Peachman, K.K., Rao, M., Barvir, D., Sun, W., & Palmer, D.R. (2004) Modulation of Dengue Virus Infection of Dendritic Cells by *Aedes aegypti* saliva. *Viral Immunology*, 17, 252–265.

Afrane, Y.A., Zhou, G., Lawson, B.W., Githeko, A.K., & Yan, G. (2007) Life-table analysis of *Anopheles arabiensis* in western Kenya highlands: effects of land covers on larval and adult survivorship. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, 77, 660–6.

Afrane, Y.A., Little, T.J., Lawson, B.W., Githeko, A.K., & Yan, G. (2008) Deforestation and Vectorial Capacity of *Anopheles gambiae* Giles Mosquitoes in Malaria Transmission, Kenya. *Emerging Infectious Diseases*, 14, 1533–1538.

Afrane, Y.A., Zhou, G., Lawson, B.W., Githeko, A.K., & Yan, G. (2006) Effects of microclimatic changes caused by deforestation on the survivorship and reproductive fitness of *Anopheles gambiae* in western Kenya highlands. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74, 772–78.

Alam, M.S. & Tuno N. (2019) Reduction of reproductive capacity in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in hot, dry summer. *Journal of Medical Entomology*, 56, 1729–1733.

Alfonso-Parra, C., Ahmed-Braimah, Y.H., Degner, E.C., Avila, F.W., Villarreal, S.M., Pleiss, J.A., Wolfner, M., & Harrington, L.C. (2016) Mating-induced transcriptome changes in the reproductive tract of female *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10, e0004451.

Alphey, L., Benedict, M., Bellini, R., Clark, G.G., Dame, D.A., Service, M.W., & Dobson, S.L. (2010) Sterile-Insect methods for control of mosquito-borne diseases: An Analysis. *Vector-Borne Zoonotic Diseases*, 10, 295–311.

Al-Rashidi, H.S., Alghamdi, K.M., Al-Otaibi, W.M., Al-Solami, H.M., & Mahyoub, J.A. (2022) Effects of blood meal sources on the biological characteristics of *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29, 103448.

Alto, B. W., Malicoate, J., Elliott, S. M., & Taylor, J. (2012) Demographic Consequences of Predators on Prey: Trait and Density Mediated Effects on Mosquito Larvae in Containers. *PLoS ONE*, 7, e45785.

Alto, B.W., Lounibos, L.P., Mores, C.N., & Reiskind, M.H. (2008) Larval competition alters susceptibility of adult *Aedes* mosquitoes to dengue infection. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275, 463–471.

Alto, B.W., Muturi, E.J., & Lampman, R.L. (2012) Effects of nutrition and density in *Culex pipiens*. *Medical and Veterinary Entomology*, 26, 396–406.

Alto, B.W., Reiskind, M.H., & Lounibos, L.P. (2008) Size alters susceptibility of vectors to dengue virus infection and dissemination. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 79, 688–95.

Amaro, I.A., Ahmed-Braimah, Y.H., Pitcher, S.A., League, G.P., Avila, F.W., Cruz, P.C., Jarrington, L.C., & Wolfner, M.F. (2021) Seminal fluid proteins induce transcriptome changes in the *Aedes aegypti* female lower reproductive tract, including up-regulation of immunity-related RNAs. *BMC Genomics*, 22, 896.

Amusan, A.A., Idowu, A.B., & Arowolo, F.S. (2005) Comparative toxicity effect of bush tea leaves (*Hyptis suaveolens*) and orange peel (*Citrus sinensis*) oil extract on larvae of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. Tanzania Health Research Bulletin, 7, 174-178.

Andreasen, M., & Curtis, C.F. (2005) Optimal life stage for radiation sterilization of *Anopheles* males and their fitness for release. Medical and Veterinary Entomology, 19, 238–244.

Anderson, J.F., Ferrandino, F.J., Dingman, D.W., Main, A.J., Andreadis, T.G., & Becnel, J.J. (2011) Control of Mosquitoes in Catch Basins in Connecticut With *Bacillus thuringiensis israelensis*, *Bacillus sphaericus*, and Spinosad. Journal of the American Mosquito Control Association, 27, 45–55.

Anderson, R.M., & May, R.M. (1991) Infectious diseases of humans: dynamics and control. Oxford, UK: Oxford University Press

Andreadis, S.S., Dimotsiou, O.C., & Savopoulou-Soultani, M. (2014) Variation in adult longevity of *Culex pipiens* f. *pipiens*, vector of the West Nile Virus. Parasitology Research, 13, 4315-9.

Anon (2014) A Global Brief on Vector-Borne Diseases. Geneva: World Health Organization.

Apperson, C.S., Hassan, H.K., Harrison, B.A., Savage, H.M., Aspen, S.E., Farajollahi, A., Crans, W., Daniels, T.J., Falco, R.C., Benedict, M., Anderson, M., McMillen, L., & Unnasch, T.U. (2004) Host feeding patterns of established and potential mosquito vectors of West Nile virus in the eastern United States. Vector Borne Zoonotic Disease, 4, 71-82.

Aranda, C., Eritja, R., & Roiz, D. (2006) First record and establishment of the mosquito *Aedes albopictus* in Spain. Medical and Veterinary Entomology, 20, 150-2.

Armbruster, P., & Hutchinson, R. A. (2002) Pupal Mass and Wing Length as Indicators of Fecundity in *Aedes albopictus* and *Aedes geniculatus* (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology, 39, 699–704.

Arnqvist, G., & Nilsson, T. (2000) The evolution of polyandry: multiple mating

and female fitness in insects. *Animal Behaviour*, 60, 145–164.

Arrese, E.L., & Soulages, J.L. (2010) Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual Review Entomology*, 55, 207–25.

Attardo, G.M., Hansen, I.A., & Raikhel, A.S. (2005) Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: implications for anautogeny. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 661–675.

Atyame, C. M., Pasteur, N., Dumas, E., Tortosa, P., Tantely, M. L., Pocquet, N., Licciardi, S., Bheecarry, A., Zumbo, B., Weill, M., & Duron, O. (2011) Cytoplasmic Incompatibility as a Means of *Controlling Culex pipiens quinquefasciatus* Mosquito in the Islands of the South-Western Indian Ocean. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5, e1440.

Ayrinhac, A., Gibert, P., Legout, H., Moreteau, B., & Vergilino, R. (2004) Cold adaptation in geographical populations of *Drosophila melanogaster*: phenotypic plasticity is more important than genetic variability. *Functional Ecology*, 18, 700-706.

Azari-Hamidian, S., Norouzi, B., & Harbach, R.A. (2019) A detailed review of the mosquitoes (Diptera: Culicidae) of Iran and their medical and veterinary importance. *Acta Tropica*, 194, 106-122.

Avila, F.W., Sirot, L.K., LaFlamme, B.A., Rubinstein, C.D., & Wolfner, M.F. (2011) Insect seminal fluid proteins: Identification and function. *Annual Review of Entomology*, 56: 21–40.

B

Badieritakis, E., Papachristos, D., Latinopoulos, D., Stefopoulou, A., Kolimenakis, A., Bithas, K., Patsoula, E., Beleri, S., Maselou, D., Balatsos, G., & Michaelakis, A. (2018) *Aedes albopictus* (Skuse, 1895) (Diptera: Culicidae) in Greece: 13 years of living with the Asian tiger mosquito. *Parasitology Research*, 117, 453–460.

Bahnck, C.M., & Fonseca, D.M., (2006) Rapid assay to identify the two genetic forms of *Culex* (*Culex*) *pipiens* L. (Diptera: Culicidae) and hybrid populations.

American Journal of Tropical Medicine Hygiene, 75, 251–255.

Baker, R.H., Reisen, W.K., Sakai, R.K., Hayes, C.G., Aslamkhan, M., Saifuddin, U.T., Mahmood, F., Perveen, A., & Javed, S. (1979) Field assessment of mating competitiveness of male *Culex tritaeniorhynchus* carrying a complex chromosomal aberration. Annals of the Entomological Society of America, 72, 751–758.

Bakri, A., Heather, N., Hendrichs, J., & Ferris, I. (2005a) Fifty years of radiation biology in entomology: Lessons learned from IDIDAS. Annals of the Entomological Society of America, 98, 1-12.

Balatsos, G., Puggioli, A., Karras, V., Lytra, I., Mastronikolos, G., Carrieri, M., Papachristos, D.P., Malfacini, M., Stefopoulou, A., Ioannou, C.S., Balestrino, F., Bouyer, J., Petrić, D., Pajović, I., Kapranas, A., Papadopoulos, N.T., Milonas, P.G., Bellini, R., & Michaelakis, A. (2021) Reduction in egg fertility of *Aedes albopictus* mosquitoes in Greece following releases of imported sterile males. Insects, 12, 110.

Baldacchino, F., Caputo, B., Chandre, F., Drago, A., della Torre, A., Montarsi, F., & Rizzoli, A. (2015) Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: a review. Pest Management Science, 71, 1471–1485.

Baldini, F., Gabrieli, P., Rogers, D. W., & Catteruccia, F. (2012) Function and composition of male accessory gland secretions in *Anopheles gambiae*: a comparison with other insect vectors of infectious diseases. Pathogens and Global Health, 106, 82–93.

Balenghien, T., Vazeille, M., Grandadam, M., Schaffner, F., Zeller, H., Reiter, P., Sabatier, P., Fouque, F., & Bicout, D.J. (2008) Vector competence of some French *Culex* and *Aedes* mosquitoes for West Nile Virus. Vector-Borne Zoonotic Diseases, 8, 589-96.

Balestrino, F., Medici, A., Candini, G., Carrieri, M., McCagnani, B., Calvitti, M., Maini, S., & Bellini, R. (2010) X-Ray dosimetry and mating capacity studies in the laboratory on *Aedes albopictus* males. Journal of Medical Entomology, 47, 581–591.

Balestrino, F., Puggioli, A., Carrieri, M., Bouyer, J., & Bellini, R. (2017) Quality Control Methods for *Aedes Albopictus* Sterile Male Production. PLoS Neglected Tropical Disease, 11, e0005881.

Barr, A.R. (1957) The distribution of *Culex pipiens pipiens* and *Culex pipiens quinquefasciatus* in North America. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 6, 153-165.

Barrion, A.A. (1985) Selection on resistant rice varieties and genetics of rice-infesting biotypes of brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal) (Hemiptera: Delphacidae). Ph.D. thesis, University of the Philippines at Los Banos, Laguna, Philippines.

Barry, J. D., Blessinger, T., & Morse, J. G. (2004) Recapture of Sterile Mediterranean Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) in California's Preventative Release Program. Journal of Economic Entomology, 5, 1554–1562.

Bartholomay, L.C., Fuchs, J.F., Cheng, L.L., Beck, E.T., Vizioli, J., Lowenberger C., & Christensen, B.M. (2004) Reassessing the role of defensin in the innate immune response of the mosquito, *Aedes aegypti*. Insect Molecular Biology, 13, 125–32.

Battaglia, V., Gabrieli, P., Brandini, S., Capodiferro, M.R., Javier, P.A., Chen, X.-G., Achilli, A., Semino, O., Gomulski, L.M., Malacrida, A.R., Gasperi, G., Torroni, A., & Olivieri, A. (2016) The Worldwide Spread of the Tiger Mosquito as Revealed by Mitogenome Haplogroup Diversity. Frontiers in Genetics, 7, 208.

Batz, Z. A., & Armbruster, P. A. (2018) Diapause-associated changes in the lipid and metabolite profile of the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*. The Journal of Experimental Biology, 221, jeb.189480.

Beach, R. (1978) The required day number and timely induction of diapause in geographic strains of the mosquito *Aedes atropalpus*. Journal of Insect Physiology, 24, 449–455.

Beach, R.F., & Craig Jr., G.B. (1977) Night length measurements by circadian clock controlling diapause induction in the mosquito *Aedes atropalpus*. Journal of Insect Physiology, 23, 865-870.

Becker, N., D. Petri , M. Zgomba, C. Boase, C. Dahl, J. Lane, & A. Kaiser. (2003) Mosquitoes and their control. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Becker, N., Jost, A., & Weitzel, T. (2012) The *Culex pipiens* complex in Europe. Journal of the American Mosquito Control Association, 28, 53–67.

Becker, N., Petri , D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M., Dahl, C., & Kaiser, A. (2010) Mosquitoes and their control. 2nd ed. Heidelberg, Dordrecht, New York: Springer

Becker, N., Petric, D., Zgomba, M., Boase C., Madon, B.M., Dahl., C., & Kaiser, A. (2020) Mosquitoes. Identification, ecology & control. Third, edition, Springer, Heidelberg, Germany, 570 pp.

Beier, J.C. (1996) Frequent blood-feeding and restrictive sugar-feeding behavior enhance the malaria vector potential of *Anopheles gambiae* s.l. and *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) in western Kenya. Journal of Medical Entomology, 33, 613 - 688.

Bellamy, R.E., & Bracken, G.K. (1971) Quantitative aspects of ovarian development in mosquitoes, The Canadian Entomologist, 103, 763–773.

Bellini, R. (2022) Safety, regulatory and environmental issues with SIT-based mosquito vector control in European countries. Revue Scientific et Technique, 41, 170-177.

Bellini, R., Albieri, A., Balestrino, F., Carrieri, M., Porretta, D., Urbanelli, S., Calvitti, M., Moretti, R., & Maini, S. (2010) Dispersal and survival of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) males in Italian urban areas and significance for Sterile Insect Technique application. Journal Medical Entomology, 47, 1082–1091.

Bellini, R., Balestrino, F., Medici, A., Gentile, G., Veronesi, R., & Carrieri, M. (2013) Mating Competitiveness of *Aedes Albopictus* Radio-Sterilized Males in Large Enclosures Exposed to Natural Conditions. Journal of Medical Entomology, 50, 94–102.

Bellini, R., Calvitti, M., Medici, A., Carrieri, M., Celli, G., & Maini, S. (2007)

Use of the Sterile Insect Technique against *Aedes albopictus* in Italy: First results of a pilot trial. In *Area-Wide Control of Insect Pests: From Research to Field Implementation*; Springer: Dordrecht, The Netherlands.

Bellini, R., Carrieri, M., Balestrino, F., Puggioli, A., Malfacini, M., & Bouyer, J. (2021) Field competitiveness of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) irradiated males in pilot Sterile Insect Technique trials in northern Italy. *Journal of Medical Entomology*, 58, 807–813.

Bellini, R., Medici, A., Puggioli, A., Balestrino, F., & Carrieri, M. (2013) Pilot field trials with *Aedes albopictus* irradiated sterile males in Italian urban areas. *Journal of Medical Entomology*, 50, 317–325.

Bellini, R., Michaelakis, A., Petrić, D., Schaffner, F., Alten, B., Angelini, P., Aranda, C., Becker, N., Carrieri, M., Di Luca, M.; Fălcuță, E., Flacio, E., Klobučar, A., Lagneau, C., Merdić, E., Mikov, O., Pajovic, I., Papachristos, D., Carla A Sousa, Stroo, A., Toma, L., Vasquez, M.I., Velo, E., Venturelli, C., & Zgomba, M. (2020) Practical management plan for invasive mosquito species in Europe: I. Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*). *Travel Medicine and Infectious Disease*, 35, 101691.

Bellini, R., Zeller, H., & Van Bortel, W. (2014) A review of the vector management methods to prevent and control outbreaks of West Nile virus infection and the challenge for Europe. *Parasites & Vectors*, 7, 323.

Benedict, M., & Robinson, A. S (2003) The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. *Trends in Parasitology*, 8, 349–355.

Benedict, M.Q., Levine, R.S., Hawley, W.A., & Lounibos, L.P. (2007) Spread of The Tiger: Global Risk of Invasion by The Mosquito *Aedes albopictus*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 7, 76-85.

Benedict, M.Q., Knols, B.G.J., Bossin, H.C., Howell, P.I., Mialhe, E., Caceres, C., & Robinson, A.S. (2009) Colonisation and mass rearing: Learning from others. *Malaria Journal*, 8(2): 4.

Bengoa, M., Eritja, R., & Lucientes, J (2014) Ground Ultra-Low Volume Adulticiding Field Trials Using Pyrethroids Against *Aedes albopictus* in the Baix

Llobregat Region, Spain. Journal of the American Mosquito Control Association, 1, 42-50.

Benoit, J.B., & Denlinger D.L. (2007) Suppression of water loss during adult diapause in the northern house mosquito, *Culex pipiens*. Journal of Experimental Biology 210, 217-226.

Benoit J.B., Lopez-Martinez G., Phillips Z.P., Patrick K.R., & Denlinger D.L. (2010) Heat shock proteins contribute to mosquito dehydration tolerance. Journal of Insect Physiology 56, 151-156.

Bergsten, J., Bilton, D.T., Fujisawa, T., Elliott, M., Monaghan, M.T., Balke, M., Hendrich, L., Geijer, J., Herrmann, J., Foster, G.N., Ribera, I., Nilsson, A.N., Barraclough, T.G., & Vogler, A.P. (2012) The effect of geographical scale of sampling on DNA barcoding. Syst Biol 61, 851-69.

Bisia, M., Jeffries, C.L., Lytra, I., Michaelakis, A., & Walker, T. (2020) A Comparison of Adult Mosquito Trapping Methods to Assess Potential West Nile Virus Mosquito Vectors in Greece during the Onset of the 2018 Transmission Season. Insects 11, 329.

Bian, G., Zhou, G., Lu, P., & Xi, Z. (2013) Replacing a Native Wolbachia with a Novel Strain Results in an Increase in Endosymbiont Load and Resistance to Dengue Virus in a Mosquito Vector. PLoS Neglected Tropical Diseases, 7, e2250.

Bloem, S., Bloem, K.S. & Night, A.L.K. (1998) Assessing the quality of mass-reared codling moths (Lepidoptera: Tortricidae) by using field release recapture tests: Journal of Economic Entomology. 91: 1122-1130.

Bloem, S., Carpenter, J.E, Bloem, K.A., Tomlin, L., & Aggart, S.T. (2004) Effect of rearing strategy and gamma radiation on field competitiveness of mass reared codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). Journal of Economic Entomology, 97, 1891-1898.

Bloem, K. A., & Bloem, S. (2000) SIT for codling moth eradication in British Columbia, Canada, pp. 207-214. In Tan, K. H. (ed.), Proceedings: Area-Wide Control of Fruit Flies and Other Insect Pests. International Conference on Area-Wide Control of Insect Pests, and the 5th International Symposium on Fruit [253]

Flies of Economic Importance, 28 May-5 June 1998, Penang, Malaysia.
Penerbit Universiti Sains Malaysia, Pulau Pinang, Malaysia.

Bloem, S., Bloem, K.A., Carpenter, J.E. & Calcins, C.O. (1999) Inherited sterility in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae): Effect of substerilizing doses of radiation on field competitiveness. *Environmental Entomology*, 28, 669-674.

Bonds, J.A.S. (2012) Ultra-low-volume space sprays in mosquito control: a critical review. *Medical and Veterinary Entomology*, 26, 121–130.

Bonizzoni, M., Gasperi, G., Chen, X., & James, A.A. (2013) The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives. *Trends Parasitology*, 29, 460–468.

Boshra, S.A. (1994) Effects of gamma radiation on reproduction, mating competitiveness and sperm activity of *Callosobruchus chinensis* (L.). *Qatar University Science Journal*, 14, 298-302.

Bourtzis, K., Lees, R. S., Hendrichs, J., & Vreysen, M. J. B. (2016) More than one rabbit out of the hat: Radiation, transgenic and symbiont-based approaches for sustainable management of mosquito and tsetse fly populations. *Acta Tropica*, 157, 115–130.

Bowen, M.F. (1991) The Sensory Physiology of Host-Seeking Behavior in Mosquitoes. *Annual Review of Entomology*, 36, 139-158.

Bowen, R.A., & Nemeth, N.M. (2007) Experimental infections with West Nile virus. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 20, 293–297.

Bouyer, J., & Lefrançois, T. (2014) Boosting the sterile insect technique to control mosquitoes. *Trends Parasitology*, 6, 271-3.

Bouyer, J., Yamada, H., Pereira, R., Bourtzis, K., & Vreysen, M. J. B. (2020) Phased Conditional Approach for Mosquito Management Using Sterile Insect Technique. *Trends in Parasitology*.

Bourtzis, K., Dobson, S. L., Xi, Z., Rasgon, J. L., Calvitti, M., Moreira, L. A., Bossin, H. C., Moretti, R., Baton, L. A., Huhes, G. L., Mavingui, P., & Gilles, J. R. L. (2014) Harnessing mosquito–*Wolbachia* symbiosis for vector and disease control. *Acta Tropica*, 132, 150–163

Bradshaw, M.E., & Holzapfel, C.M. (1992) Resource limitation, habitat segregation, and species interactions of british tree-hole mosquitoes in nature. *Oecologia*, 90, 227–237.

Braks, M.A.H., Anderson, R.A., & Knols, B.G.J., (1999) Infochemicals in mosquito host selection: Human skin microflora and *Plasmodium* parasites. *Parasitology Today*, 15, 409-413.

Briegel, H. (1990) Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*, 36:165–72.

Briegel, H., & Timmermann, S.E. (2001) *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): Physiological Aspects of Development and Reproduction. *Journal of Medical Entomology*, 38, 566–571.

Bruce-Chwatt, L.J., Draper, C.C., Avramidis, D., & Kazandzoglou O. (1975) Sero-epidemiological surveillance of disappearing malaria in Greece. *Journal of Tropical Medicine Hygiene*, 78, 194e200.

Bruce-Chwatt, L., & Zulueta, J. (1980) The rise and fall of malaria in Europe. New York: Oxford University Press, Oxford.

Brugman, V. A., Hernández-Triana, L.M., Medlock, J.M., Fooks, A.R., Carpenter, S., & Johnson, S. (2018) The role of *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) in virus transmission in Europe. *International Journal of Environment Research and Public Health*, 15, 389.

Buckley, A., Dawson, S.R., Moss, S.A., Hinsley, P.E., & Bellamy, E.A. (2003) Gould Serological evidence of West Nile virus, Usutu virus and Sindbis virus infection of birds in the UK. *Journal of General Virology*, 84, 2807-2817.

Butail, S., Manoukis, N., Diallo, M., Ribeiro, J.M., Lehmann, T., & Paley, D.A. (2012) Reconstructing the flight kinematics of swarming and mating in wild mosquitoes. *Journal of the Royal Society Interface*, 9, 2624–2638.

Butail, S., Manoukis, N.C., Diallo, M., Ribeiro, J.M., & Paley, D.A. (2013) The dance of male *Anopheles gambiae* in wild mating swarms. *Journal of Medical Entomology*, 50, 552–559.

Buxton, P.A. (1935) Changes in the composition of adult *Culex pipiens* during

hibernation. *Parasitology* 27, 263–265.

Byrne, K., & Nichols, R.A. (1999) *Culex pipiens* in London Underground tunnels: differentiation between surface and subterranean populations. *Heredity*, 82, 7–15.

C

Calzolari, M., Pautasso, A., Montarsi, F., Albieri, A., Bellini, R., Bonilauri, P., Defilippo, F., Lelli, D., Moreno, A., Chiari, M., Tamba, M., Zanoni, M., Varisco, G., Bertolini, S., Modesto, P., Radaelli, M.C., Iulini, B., Prearo, M., Ravagnan, S., Cazzin, S., Mulatti, P., Monne, I., Bonfanti, L., Marangon, S., Goffredo, M., Savini, G., Martini, S., Mosca, A., Farioli, M., Brenzoni, L.G., Palei, M., Russo, F., Natalini, S., Angelini, P., Casalone, C., Dottori, M., & Capelli, G. (2015) West Nile Virus surveillance in 2013 via mosquito screening in northern Italy and the influence of weather on virus circulation. *PLoS One*, 10, e0140915.

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. *Journal of The Royal Society Interface*, 9, 2708-17.

Caputo, B., Ienco, A., Cianci, D., Pombi, M., Petrarca, V., Baseggio, A., Devine, G.J., & della Torre, A. (2012) The “Auto-Dissemination” Approach: A Novel Concept to Fight *Aedes albopictus* in Urban Areas. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6, e1793.

Caraballo H., & King K. (2014) Emergency department management of mosquito borne illness: Malaria, dengue, and west nile virus, *Emergency Medicine Practice*, 16, 1–23.

Cardamatis, J.P. (1931a) Les especes de moustiques en Greece et tout particulier- ment d' Athenes. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*. 24, 122-131.

Carpenter, J.E., Blomefield, T., & Vreysen, M.J.B. (2012) A flight cylinder bioassay as a simple, effective quality control test for *Cydia pomonella*. *Journal*

of Applied Entomology, 136, 711–720.

Cartaxo, M.F.S., Ayres, C.F.J., & Weetman, D. (2011) Loss of genetic diversity in *Culex quinquefasciatus* targeted by a lymphatic filariasis vector control program in Recife, Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 105, 491–499.

Cator, L.J., Wyer, C.A.S., & Harrington, L.C. (2021) Mosquito sexual selection and reproductive control programs. Trends Parasitology, 37, 330–339.

Cayol, J.P., Coronado, P., & Taher, M. (2002) Sexual compatibility in medfly (Diptera: Tephritidae) from different origins. Florida Entomologist, 85, 51–57.

Centers for disease control and prevention (CDC) (2020) *Dirofilariasis* FAQs, Content source: Global Health, Division of Parasitic Diseases.

Centers for disease control and prevention (CDC) (2023) Chikungunya virus, <https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/chikungunya-in-the-us.html>

Ceretti-Júnior, W., Medeiros-Sousa, A. R., Multini, L. C., Urbinatti, P. R., Vendrami, D. P., Natal, D., Marques, S., Fernandes, A., Ogata, H., & Marrelli, M. T. (2014) Immature mosquitoes in bamboo internodes in municipal parks, city of São Paulo, Brazil. Journal of American Mosquito Control Association, 30, 268-275.

Chancey, C., A. Grinev, E. Volkova, & M. Rios. (2015) The global ecology and epidemiology of West Nile virus. Biomed Research International, 2015, 376230.

Chansang, C., Chansang, U., Mongkalagoon, P., Kittayapong, P., Ninphanomchai, S., & Limohpasmanee, W. (2019) Combined sterile insect technique and incompatible insect technique: The first proof-of-concept to suppress *Aedes aegypti* vector populations in semi-rural settings in Thailand. PLoS Neglected tropical Diseases, 13, e0007771.

Chandrasegaran, K. (2020) Linking mosquito ecology, traits, behavior, and disease transmission. Trends Parasitology, 36, 393–403.

Chang, K.-S., Shin, E.-H., Yoo, D.-H., & Ahn, Y.-J. (2014) Enhanced Toxicity

of Binary Mixtures of *Bacillus thuringiensis* subsp.*israelensis* and Three Essential Oil Major Constituents to Wild *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology, 51, 804–810.

Chapman, T., Miyatake, T., Smith, H.K., & Partridge, L. (1998) Interactions of mating, egg production and death rates in females of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 265, 1879–1894.

Charlwood, J.D., Pinto, J., Sousa, C.A., Madsen, H., Ferreira, C., & do Rosario, V.E. (2002) The swarming and mating behaviour of *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) from Sao Tome Island. Journal of Vector Ecology, 27, 178–183.

Charlwood, J.D., Thompson, R. & Madsen, H., (2003) Observations on the swarming and mating behaviour of *Anopheles funestus* from southern Mozambique. Malaria Journal, 2 (2).

Chaskopoulou, A., Latham, M.D., Pereira, R.M., Connelly, R., Bonds, J.A.S., & Koehler, P.G. (2011b) Efficacy of aerial ultra-low volume applications of two novel water-based formulations of unsynergized pyrethroids against riceland mosquitoes in Greece. Journal of American Mosquito Control Association, 27, 414–422.

Chaves, L.F., Morrison, A.C., Kitron, U.D., & Scott, T.W. (2012) Nonlinear impacts of climatic variability on the density dependent regulation of an insect vector of disease. Global Change Biology, 18, 457–468

Chaves, L.F., & Koenraadt, C.J.M. (2010) Climate change and highland malaria: fresh air for a hot debate. The Quarterly Review of Biology, 85, 27–55.

Chevillon, C., Eritja, R., Pasteur, N., & Raymond, M. (1995) Commensalism, adaptation and gene flow: mosquitoes of the *Culex pipiens* complex in different habitats. Genetics and Molecular Research, 66, 147–57.

Chevillon, C., Bourguet, D., Rousset, F., Pasteur, N., & Raymond, M. (1998) Pleiotropy of adaptive changes in populations: comparisons among insecticide resistance genes in *Culex pipiens*. Genetic and Molecular Research, 70, 195–
[258]

Chiba, Y., Shinkawa, Y., Yoshii, M., Matsumoto, A., Tomioka, K., & Takahashi, S.Y. (1992) A comparative study on insemination dependency of circadian activity pattern in mosquitoes. *Physiological Entomology*, 17, 213–218.

Chiba, Y., Yamamoto, Y., Shimizu, C., Zaitzu, M., Uki, M., Yoshii, M., & Tomioka, K. (1990) Insemination-dependent modification of circadian activity of the mosquito, *Culex pipiens pallens*. *Zoological Science*, 7, 895–906.

Chikwendu J.I., Onekutu A., & Ogbonna I. (2019) Effects of host blood on fecundity and longevity of female *Anopheles* mosquitoes. *International Journal of Pathology and Research*, 3, 1–7.

Chung, H.N., Rodriguez, S.D., Gonzales, K.K., Vulcan, J., Cordova, J.J., Mitra, S., Adams, C.G., Moses-Gonzales, N., Tam, N., Cluck, J.W., Attardo, G.M., & Hansen, I.A. (2018) Toward Implementation of Mosquito Sterile Insect Technique: The effect of storage conditions on survival of male *Aedes aegypti* mosquitoes (Diptera: Culicidae) during transport. *Journal of Insect Science*, 18, 2.

Ciota, A.T., Drummond, C.L., Drobnack, J., Ruby, M.A., Kramer, L.D., & Ebel, G.D. (2011) Emergence of *Culex pipiens* from overwintering hibernacula. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 27, 21-9.

Ciota, A. T., Matakchiero, A.C., Kilpatrick, A.M., & Kramer, L.D. (2014) The effect of temperature on life history traits of *Culex* mosquitoes. *Journal of Medical Entomology*, 51, 55–62.

Cipolla, S.S., & Maglionico, M. (2014) Heat Recovery from Urban Wastewater: Analysis of the Variability of Flow Rate and Temperature in the Sewer of Bologna, Italy. *Energy Procedia*, 45, 288–297.

Collins, C.M., & Michaelakis, A. (2022) Managing stakeholder concerns associated with releases of imported stock in insect control programmes. *Revue Scientific et Technique*, 41, 191-197.

Cook, P.E., Hugo, L.E., Iturbe-Ormaetxe, I., Williams, C.R., Chenoweth,

- S.F., Ritchie, S.A., Ryan, P.A., Kay, B.H., Blows, M.W., & O'Neill, S.L. (2006)** The use of transcriptional profiles to predict adult mosquito age under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 18060–18065.
- Cook, P.E., McMeniman, C.J., & O'Neil, S. L. (2008)** Modifying insect population age structure to control vector-borne disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 627, 126–140.
- Consoli, R.A.G.B., & Lourenço-de-Oliveira, R. (1994)** Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. 1st ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ.
- Corbel, V., Nosten, F., Thanispong, K., Luxemburger, C., Kongmee, M., & Chareonviriyaphap, T. (2013)** Challenges and prospects for dengue and malaria control in Thailand, Southeast Asia. *Trends Parasitol* 29, 623–633.
- Cot and Hovasse (1917)** Quelques remarques sur les anophelines en Macédoine. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 10, 890.
- Costantini, C., Birkett, M.A., Gibson, G., Ziesmann, J., Sagnon, N.F., Healy, T. P., & Copland, M. J. W. (2000)** Human sweat and 2-oxopentanoic acid elicit a landing response from *Anopheles gambiae*. *Medical and Veterinary Entomology*, 14, 195–200.
- Costero, A., Edman, J. D., Clark, G. G., & Scott, T. W. (1998)** Life Table Study of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Puerto Rico Fed Only Human Blood Versus Blood Plus Sugar. *Journal of Medical Entomology*, 35, 809–813.
- Clements, A.N. (1992)** The biology of mosquitoes: development, nutrition and reproduction, Chapman & Hall, London, United Kingdom, 1, 509.
- Clements, A.N. (1999)** The biology of mosquitoes. CABI Publishing, New York, 740.
- Craig, Jr. G.B. (1967)** Mosquitoes: Female monogamy induced by male accessory gland substance. *Science*.156, 1499–1501.
- Cui, G., Zhong, S., Zheng, T., Li, Z., Zhang, X., Li, C., Hemming-Schroeder, E., Zhou, G., & Li, Y. (2021)** *Aedes albopictus* life table: environment, food,

and age dependence survivorship and reproduction in a tropical area. *Parasites & Vector*, 14, 568.

Culbert, N.J., Balestrino, F., Dor, A., Herranz, G.S., Yamada, H., Wallner, T., & Bouyer, J. (2018) A rapid quality control test to foster the development of genetic control in mosquitoes. *Scientific Reports*, 8, 16179.

Culbert, N.J., Kaiser, M., Venter, N., Vreysen, M.J.B., Gilles, J.R.L., & Bouyer, J. A (2020) Standardised method of marking male mosquitoes with fluorescent dust. *Parasites Vectors*, 13, 1–11.

Curtis, C.F., & Sinkins, S.P. (1998) Wolbachia as a possible means of driving genes into populations. *Parasitology*, 116, 111–115.

D

Dabiré, K.R., Sawadogo, P.S., Hien, D.F., Bimbilé-Somda, N.S., Soma, D.D., Millogo, A., Baldet, T., Gouagna, L.C., Simard, F., Lefèvre, T., Diabaté, A., Lees, R.S., & Gilles, J.R.L. (2014) Occurrence of natural *Anopheles arabiensis* swarms in an urban area of Bobo-Dioulasso City, Burkina Faso, West Africa. *Acta Tropica*, 132, 35–41.

Dame, D.A., Benedict, M.Q., Robinson, A.S., & Knols, B.G. (2009) Historical applications of induced sterilization in field populations of mosquitoes. *Malaria Journal*, 8, 2.

Daniel, T.L., & Kingsolver, J.G. (1983) Feeding strategy and the mechanics of blood sucking in insects. *Journal of Theoretical Biology*, 105, 661-672.

Danis, K., Papa, A., Papanikolaou, E., Dougas, G., Terzaki, I., Baka, A., Vrioni, G., Kapsimali, V., Tsakris, A., Kansouzidou, A., Tsiodras, S., Vakalis, N., Bonovas, S., & Kremastinou, J. (2011) Ongoing outbreak of West Nile virus infection in humans, Greece, July to August 2011. *Eurosurveillance*, 16,34.

Darbro, J.M., Ritchie, S.A., Thomas, M.B., Johnson, P.H., Ryan, P.A., & Kay, B.H. (2012) Effects of *Beauveria bassiana* on Survival, Blood-Feeding Success, and Fecundity of *Aedes aegypti* in Laboratory and Semi-Field

Conditions. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 86, 656–664.

Darriet, F. (2017) Synergistic Effect of Fertilizer and Plant Material Combinations on the Development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) Mosquitoes. Journal of Medical Entomology, 55, 496–500.

Darsie, R.F.J., & Samanidou-Voyadjoglou, A. (1997) Keys for the identification of the mosquitoes of Greece. Journal of the American Mosquito Control Association, 13, 247–254.

Day, J.F., Edman, J.D., & Scott, T.W. (1994) Reproductive Fitness and Survivorship of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Maintained on Blood, with Field Observations from Thailand. Journal of Medical Entomology, 31, 611–617.

De, S., Sharma, G., Bhattacharjee, R., Mandal, U., Banerjee, D., & Suman, D.S. (2022) Life table, survival, and fecundity parameters of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) strains from desert and coastal regions of India. Acta Tropica, 235, 106625.

de Azara, T.M.F, Degener, C.M., Roque, R.A., Ohly, J.J., Geier, M., & Eiras, A.E. (2013) The impact of CO₂ on collection of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Culex quinquefasciatus* Say by BG-Sentinel (R) traps in Manaus, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 108, 229–232.

de Boissezon, P. (1929) Notes on the reproduction of *Culex pipiens* L. in winter. Bulletin de la Société de pathologie exotique, 22, 549–553.

de Lamballerie, X., Leroy, E., Charrel, R.N., Tsetsarkin, K., Higgs, S., & Gould, E.A. (2008) Chikungunya virus adapts to tiger mosquito via evolutionary convergence: a sign of things to come? Virology Journal, 5, 33.

Degner, E.C., & Harrington, L.C. (2016) Polyandry depends on postmating time interval in the dengue vector *Aedes aegypti*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 94, 780–785.

Dekker, T., & Takken, W. (1998) Differential responses of mosquito sibling

species *Anopheles arabiensis* and *Anopheles quadriannulatus* carbon dioxide, a man or a calf. Medical and Veterinary Entomology, 12, 136-140.

Dekker, T., Takken, W., & Braks, M.H.A. (2001a) Innate preference for host-odor blends modulates degree of anthropophagy of *Anopheles gambiae* sensu lato (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology, 38, 868-871.

Dekker, T., Steib, B., Carde, R.T., & Geier, M. (2002) L-lactic acid: a human-signifying host cue for the anthropophilic mosquito *Anopheles gambiae*. Medical and Veterinary Entomology, 16, 91–98.

Delatte, H., Gimonneau, G., Triboire, A., & Fontenille, D. (2009) Influence of temperature on immature development, survival, longevity, fecundity, and gonotrophic cycles of *Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue in the Indian Ocean. Journal of Medical Entomology, 46, 33-41.

Delisle, J. (1995) Effect of male and female age on the mating success of the obliquebanded leafroller *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae) under different ecological conditions. Insect Behavior, 8, 781–799.

Demeulemeester, J., Deblauwe, I., De Witte, J., Jansen, F., Hendy, A., & Madder, M. (2014) First interception of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* in Lucky bamboo shipments in Belgium. Journal of the European Mosquito Control Association, 32, 14-6.

Dennett, J.A., Bala, A., Wuithiranyagool, T., Randle, Y., Sargent, C.B., Guzman, H., Surin, M., Hassan, H.K., Reyna-Nava, M., Unnasch, T.R., Tesh, R.B., Parsons, R.E., & Bueno, R. (2007) Associations between two mosquito populations and West Nile virus in Harris County, Texas, 2003–06. Journal of American Mosquito Control Association, 23, 264–275.

Denlinger, D.L. (1991) Relationship between cold hardiness and diapause, 174 -198. In R. E. Lee and D. L. Denlinger [eds.], Insects at low temperatures. Chapman & Hall, New York.

Denlinger, D.L., & Armbruster, P.A. (2014) Mosquito diapause. Annual Review of Entomology, 59, 73-93.

Descloux, E., Mangeas, M., Menkes, C.E., Lengaigne, M., Leroy, A., Tehei,

T., Guillaumot, L., Teurlai, M., Gourinat, A-C., Benzler, J., Pfannstiel, A., Grangeon, J-P., Degallier, N., & de Lamballerie, X. (2012) Climate-based models for understanding and forecasting dengue epidemics. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6, e1470.

Devine, G.J., Perea, E.Z., Killeen, G.F., Stancil, J.D., Clark, S.J., & Morrison, A.C. (2009) Using adult mosquitoes to transfer insecticides to *Aedes aegypti* larval habitats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 11530–4.

De, S., Sharma, G., Bhattacharjee, R., Mandal, U., Banerjee, D., Shankar, D., & Suman, D. S. (2022) Life table, survival and fecundity parameters of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) strains from desert and coastal regions of India. *Acta tropica*, 235, 106625.

Dibo, M.R., Menezes, R.M.T. de, Ghirardelli, C.P., Mendonça, A.L., & Chiaravalloti, N. F. (2011) The presence of Culicidae species in medium-sized cities in the State of São Paulo, Brazil and the risk of West Nile fever and other arbovirus infection. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44, 496–503.

Dieng, H., Saifur, R.G.M., Hassan, A.A., Salmah, M.R.C., Boots, M., Satho, T., Jaal, Z., & AbuBakar, S. (2010) Indoor-Breeding of *Aedes albopictus* in Northern Peninsular Malaysia and Its Potential Epidemiological Implications. *PLoS ONE*, 5, e11790.

Dijkstra, K.B. (2018) Deadly mosquito' or 'living freshwater'? *Science*, 361, 341.

Di Luca, M.L., Toma, D., Boccolini, F., Severini, G., La Rosa, G., Minelli, G., Bongiorno, G., Montarsi, F., Arnoldi, D., Capelli, G., Rizzoli, A., & Romi, R. (2016) Ecological distribution and CQ11 genetic structure of *Culex pipiens* Complex (Diptera: Culicidae) in Italy. *PLoS One* 11, e0146476.

Dimond, J.B., Lea, A.O., Hahnert, W.F., & DeLong, D.M. (1956) The amino acids required for egg production in *Aedes aegypti*. *The Canadian Entomology*, 88, 57-62.

Do, T.T., Martens, P., Luu, N., Wright, P., & Choisy, M. (2014) Climatic-driven

seasonality of emerging dengue fever in Hanoi, Vietnam. BMC Public Health, 14: 1078.

Dobrotworsky, N.V. (1954) The *Culex pipiens* group in South-Eastern Australia. III. Autogeny in *Culex pipiens* form *molestus*. Proceedings of the Linnean Society of New South Wales. 79, 65–78.

Dobrotworsky, N.V., & Drummond, F.H. (1953) The *Culex pipiens* group in south-eastern Australia. I. Proceedings of the Linnean Society of New South Wales, 78, 131–146.

Dodson, B.L., Kramer, L.D., & Rasgon, J.L. (2011) Larval nutritional stress does not affect vector competence for West Nile virus (WNV) in *Culex tarsalis*. Vector Borne Zoonotic Diseases.11, 1493–7.

Dodson, B.L., Kramer, L.D., & Rasgon, J.L. (2012) Effects of larval rearing temperature on immature development and West Nile virus vector competence of *Culex tarsalis*. Parasitology Vectors, 5, 199.

Dormont, L., Mulatier, M., Carrasco, D., & Cohuet, A. (2021) Mosquito Attractants. Journal of Chemical Ecology, 47, 351–393.

Dowling, Z., Armbruster, P., LaDeau, S.L., DeCotiis, M., Mottley, J., & Leisnham, P.T. (2013) Linking mosquito infestation to resident socioeconomic status, knowledge, and source reduction practices in suburban Washington, DC. Ecohealth, 10, 36–47.

Downe, A. E. R., & Archer, J. A. (1975) The Effects of Different Blood-Meal Sources on Digestion and Egg Production in *Culex Tarsalis* Coq. (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology, 12, 431–437.

Duchemin, J.-B., Tsy, J.-M. L. P., Rabarison, P., Roux, J., Coluzzi, M., & Costantini, C. (2001) Zoophily of *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae* in Madagascar demonstrated by odour-baited entry traps. Medical and Veterinary Entomology, 15, 50–57.

Dumont, Y., & Yatat-Djeumen, I.V. (2022) Sterile insect technique with accidental releases of sterile females. Impact on mosquito-borne diseases control when viruses are circulating. Math Bioscience, 343, 108724.

Duong, C.-V., Kang, J.-H., Nguyen, V.-V., & Bae, Y.-J. (2021) Genetic Diversity and Population Structure of the Asian Tiger Mosquito (*Aedes albopictus*) in Vietnam: Evidence for Genetic Differentiation by Climate Region. *Genes*, 12, 1579.

Dwyer, G., Dushoff, J., Elkinton, J.S., & Levin, S.A. (2000) Pathogen-driven outbreaks in forest defoliators revisited: building models from experimental data. *The American Naturalist* 156, 105–120.

Dyck, V.A., Hendrichs, J., & Robinson, A.S. (2005a) Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany.

E

Eastop, V.F. (1973) Biotypes of aphids. *Bulletin of the Entomological Society of New Zealand* 2, 40-51.

European Centre for Disease Prevention and Control (2023) *Aedes albopictus*, Fact sheet for experts.

European Centre for Disease Prevention and Control (2022) *Aedes albopictus*, Fact sheet for experts.

European Centre for Disease Prevention and Control (2018) *Aedes albopictus* – Hazard associated with mosquito species, Factsheet for experts, <https://www.ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/facts/mosquito-factsheets/aedes-albopictus>

Edman, J.D. (2004) Battling West Nile Virus and Other Mosquito-Borne Diseases: A Tribute to Dr. Maurice W. Provost. *Florida Entomologist*, 87, 412–416.

Edman, J.D., & Takken, W. (2003) Fitness advantages in multiple blood-feeding: the *Aedes aegypti* example. Takken W. (ed.) Ecological aspects for application of genetically modified mosquitoes: proceedings of the Frontis workshop on ecological challenges concerning the use of genetically modified mosquitoes for disease control. Wageningen, Frontis: Wageningen, 63-74.

Edman, J. D., Strickman, D., Kittayapong, P. & Scott, T. W. (1992) Female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand Rarely Feed on Sugar. *Journal of Medical Entomology*, 29, 1035–1038.

Edwards, F.W. (1921) A revision of the mosquitoes of the Palaearctic region. *Bulletin of Entomological Research* 12, 263-351.

Effler, P.V., Pang, L., Kitsutani, P., Vorndam, V., Nakata, M., Ayers, T., Elm, J., Tom, T., Reiter, P., Rigau-Perez, J.G., Hayes, J.M., Mills, K., Napier, M., Clark, G.G., & Gubler, D.J. (2005) Hawaii Dengue Outbreak Investigation Team et al. Dengue fever, Hawaii, 2001-2002. *Emergency Infectious Diseases*, 11, 742-9.

Egizi, A., Healy, S. P., & Fonseca, D.M (2013) Rapid blood meal scoring in anthropophilic *Aedes albopictus* and application of PCR blocking to avoid pseudogenes. *Infection Genetics and Evolution*, 16, 122–128.

Eritja, R., Escosa, R., Lucientes, J., Marquès, E., Roiz, D., & Ruiz, S. (2005) Worldwide invasion of vector mosquitoes: present European distribution and challenges for Spain. *Biological Invasions*, 7, 87–97.

Eritja, R., Ruiz-Arrondo, I., Delacour-Estrella, S., Schaffner, F., Alvarez-Chachero, J., Bengoa, M., Puig, M.A., Melero-Alcázar, R., Oltra, A., & Bartumeus, F. (2019) First detection of *Aedes japonicus* in Spain: an unexpected finding triggered by citizen science. *Parasite Vector* 12(53): 1–9.

Eklom, T. (1929) Some observations on *Stegomyia fasciata* during a visit to Greece in the autumn of 1928. *Acta Medica Scandinavica*: 70, 505-518.

Enger, D., Jöst, H., Wink, M., Börstler, J., Bosch, S., Garigliany, M.-M., & Schmidt-Chanasit, J. (2016) Reconstruction of the Evolutionary History and Dispersal of Usutu Virus, a Neglected Emerging Arbovirus in Europe and Africa. *mBio*, 7, e01938-15.

Estrada-Franco, J.G., & George, B.C. (1995) Biology, disease relationships, and control of *Aedes albopictus*. Washington, D.C; Pan American Health Organization, Technical Paper, 42.

Esu, E., Lenhart, A., Smith, L., & Horstick, O. (2010) Effectiveness of

peridomestic space spraying with insecticide on dengue transmission; systematic review. *Tropical Medicine & International Health*, 15, 619–631.

F

FAO, IAEA & USDA (2019) Product Quality Control for Sterile Mass-Reared and Released Tephritid Fruit Flies; International Atomic Energy Agency: Vienna, Austria.

Faraji, A., Egizi, A., Fonseca, D.M., Unlu, I., Crepeau, T., Healy, S.P., & Gaugler, R. (2014) Comparative host feeding patterns of the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*, in urban and suburban Northeastern USA and implications for disease transmission. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8, e3037.

Farajollahi, A., Fonseca, D.M., Kramer, L.D., & Kilpatrick M.A. (2011) “Bird biting” mosquitoes and human disease: A review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*, 11, 1577-85.

Farajollahi, A., Kesavaraju, B., Price, D.C., Williams, G.M., Healy, S.P., Gaugler, R., & Nelder, M.P. (2009) Field efficacy of BG-Sentinel and industry-standard traps for *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and West Nile virus surveillance. *Journal of Medical Entomology*, 46, 919–925.

Fargo, W.S., Inayatullah, C., Webster, J.A., & Holbert, D. (1986) Morphometric variation within apterous females of *Schizaphis graminum* biotypes. *Researches on Population Ecology*, 28, 163–172.

Fasano, A., Riccetti, N., Angelou, A., Gomez-Ramirez, J., Ferraccioli, F., Kioutsoukis, I., & Stilianakis, N.I. (2022) An epidemiological model for mosquito host selection and temperature-dependent transmission of West Nile virus. *Scientific Reports*, 12, 19946.

Fawaz, E.Y., Allan, S.A., Bernier, U.R., Obenauer, P.J., & Diclaro, J.W. (2014) Swarming mechanisms in the yellow fever mosquito: aggregation

pheromones are involved in the mating behavior of *Aedes aegypti*. Journal of Vector Ecology, 39, 347–354.

Feder, M.E., & Hofmann, G.E. (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. Annual Review of Physiology, 61, 243–282.

Fikrig, K., Martin, E., Dang, S., Kimberly St Fleur, Goldsmith, G., Qu, S., Rosenthal, H., Pitcher, S., & Harrington, L.C. (2021) The effects of host availability and fitness on *Aedes albopictus* blood feeding patterns in New York.

Fischer, K., Dierks, A., Franke, K., Geister, T.L., Liszka, M., Winter, S., & Pflicke, C. (2010) Environmental effects on temperature stress resistance in the tropical butterfly *Bicyclus anynana* PLoS One, 5, e15284.

Fischer, D., Thomas, S.M., Neteler, M., Tjaden, N.B., & Beierkuhnlein, C. (2014) Climatic suitability of *Aedes albopictus* in Europe referring to climate change projections: comparison of mechanistic and correlative niche modelling approaches. Euro Surveillance, 19, 20696.

Flores, H.A., & O'Neill, S.L. (2018) Controlling vector-borne diseases by releasing modified mosquitoes. Nature Reviews Microbiology, 16, 508–518.

Fonseca, D.M., Unlu, I., Crepeau, T., Farajollahi, A., Healy, S.P., Bartlett-Healy, K., Stickman, D., Gaugler, R., Hamilton, G., Kline, D., & Clark, G.G (2013) Area-wide management of *Aedes albopictus*. Part 2: Gauging the efficacy of traditional integrated pest control measures against urban container mosquitoes. Pest Management Science, 69, 1351–1361.

Fotakis, E.A., Mavridis, K., Kampouraki, A., Balaska, S., Tanti, F., Vlachos, G., Gewehr, S., Mourelatos, S., Papadakis, A., Kavalou, M., Nikolakakis, D., Moisaki, M., Kampanis, N., Loumpounis, M., & Vontas, J., (2022) Mosquito population structure, pathogen surveillance and insecticide resistance monitoring in urban regions of Crete, Greece. PLoS Neglected Tropical Diseases, 16, e0010186.

Fowler, K., & Partridge, L. (1989) A cost of mating in female fruitflies. Nature, 338, 760–761.

Franklinos L.H.V. (2019) The effect of global change on mosquito-borne disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 19, e302–e312.

Freyvogel, T. A., Hunter, R. L., & Smith, E. M. (1968) Nonspecific esterases in mosquitoes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 16, 765–790.

Fritz, M.L., Walker, E.D., Miller, J.R., Severson, D.W., & Dworkin, I. (2015) Divergent host preferences of above- and below-ground *Culex pipiens* mosquitoes and their hybrid offspring. *Medical and Veterinary Entomology*, 29, 115–23.

Fuchs, M.S., Craig, G.B. Jr., & Hiss, E.A. (1968) The biochemical basis of female monogamy in mosquitoes. I. Extraction of the active principle from *Aedes aegypti*. *Life Sciences*, 7, 835–839.

Fuchs, M.S., & Hiss, E.A. (1970) The partial purification and separation of the protein components of matrone from *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*, 16, 931–939.

Fulcher, A., Scott, J.M., Qualls, W.A., Müller, G.C., & Xue, R.-D. (2014) Attractive Toxic Sugar Baits Mixed With Pyriproxyfen Sprayed on Plants Against Adult and Larval *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 51, 896–899.

G

Gabrieli, P., Kakani, E.G., Mitchell, S.N., Mameli, E., Want, E.J., Anton AM, Serrao, A., Baldini, F., & Catteruccia, F. (2014) Sexual transfer of the steroid hormone 20E induces the postmating switch in *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 16353–16358.

Gao, Q., Su, F., Zhou, Y.-B., Chu, W., Cao, H., Song, L.-L., Zhou, J.-J., & Leng, P.-E. (2019) Autogeny, Fecundity, and Other Life History Traits of *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae) in Shanghai, China. *Journal of Medical Entomology*, 56, 656–664.

Gatt, P., Deeming, J.C., & Schaffner, F. (2009) First records of *Aedes*

(*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in Malta. European Mosquito Bulletin, 27, 56-64.

Giatropoulos, A., Bellini, R., Pavlopoulos, D.T., Balatsos, G., Karras, V., Mourafetis, F., Papachristos, D.P., Karamaouna, F., Carrieri, M., & Veronesi, R., (2022) Efficacy Evaluation of Oregano Essential Oil Mixed with *Bacillus thuringiensis israelensis* and Diflubenzuron against *Culex pipiens* and *Aedes albopictus* in Road Drains of Italy. Insects, 13, 977.

Giatropoulos, A., Emmanouel, N., Koliopoulos, G., & Michaelakis, A. (2012a) A study on distribution and seasonal abundance of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) population in Athens, Greece. Journal of Medical Entomology, 49, 262–269.

Giatropoulos, A.K., Michaelakis, A.N., Koliopoulos, G.T., & Pontikakos, C.M. (2012b) Records of *Aedes albopictus* and *Aedes cretinus* (Diptera: Culicidae) in Greece from 2009 to 2011. Hellenic Plant Protection Journal, 5, 49–56.

Gibson, G. (1985) Swarming behaviour of the mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*: a quantitative analysis. Physiological Entomology, 10, 283–296.

Gibson, G., & Torr, S.J. (1999) Visual and olfactory responses of haematophagous Diptera to host stimuli. Medical and Veterinary Entomology, 13, 2-23.

Gibson-Corrado, J., Smith, M. L., Xue, R.-D., & Meng, F.-X. (2017) Comparison of Two New Traps To the Biogents BG-Sentinel Trap For Collecting *Aedes albopictus* In North Florida. Journal of the American Mosquito Control Association, 33, 71–74.

Gingrich, J.B., & Williams, G.M. (2005) Host-feeding patterns of suspected West Nile virus mosquito vectors in Delaware, 2001–2002, Journal of American Mosquito Control Association, 21, 194–200.

Giatropoulos, A., Papachristos, D.P., Kimbaris, A., Koliopoulos, G., Polissiou, M.G., Emmanouel, N., & Michaelakis, A. (2012c) Evaluation of bioefficacy of three Citrus essential oils against the dengue vector *Aedes*

[271]

albopictus (Diptera: Culicidae) in correlation to their components enantiomeric distribution. Parasitology Research, 111, 2253–2263.

Giangaspero, A., Marangi, M., Latrofa, M.S., Martinelli, D., Traversa, D., Otranto, D., & Genchi, C. (2013) Evidences of increasing risk of dirofilarioses in southern Italy. Parasitology Research, 112, 1357–1361.

Gibert, P., Huey, R.B., & Gilchrist, G.W. (2001) Locomotor performance of *Drosophila melanogaster*: interactions among developmental and adult temperatures, age, and geography Evolution, 55, 205-209.

Gillett, J.D. (1955) Behaviour differences in two strains of *Aedes aegypti*. Nature, 176, 124–125.

Gillett, J.D. (1955) Variation in the hatching-response of *Aedes* eggs (Diptera: Culicidae). Bulletin of Entomological Research, 46, 241–254.

Gilott C. (2003) Male accessory gland secretions: Modulators of female reproductive physiology and behavior. Annual Review Entomology, 48, 163–184.

Gimnig, J.E., Ombok, M., Otieno, S., Kaufman, M.G., Vulule, J., M., & Walker, E., D. (2002) Density-dependent development of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) larvae in artificial habitats. Journal of Medical Entomology, 39, 162 – 172.

Gomes, A.C., Silva, N.N., Marques, G.R., & Brito, M. (2003) Host-feeding patterns of potential human disease vectors in the Paraíba Valley region, State of São Paulo, Brazil. Journal of Vector Ecology, 28, 74–78.

Gomes, B., Sousa, C.A., Novo, M.T., Freitas, F.B., Alves, R., Corte-Real, A.R., Salgueiro, P., Donnelly, M.J., Almeida, A.P.G., & Pinto, J. (2009) Asymmetric introgression between sympatric *molestus* and *pipiens* forms of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in the Comporta region, Portugal. BMC Evolution Biology, 9, 262.

Gomes, B., Sousa, C.A., Vicente, J.L., Pinho, L., Caldero'n, I., Arez, E., Almeida, A.P., Donnelly, M.J., & Pinto, J. (2013) Feeding patterns of *molestus* and *pipiens* forms of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in a region of

high hybridization. *Parasites & Vectors*, 6, 93.

Gomes, B., Kioulos, E., Papa, A., Almeida, A.P.G., Vontas, J., & Pinto, J. (2013) Distribution and hybridization of *Culex pipiens* forms in Greece during the West Nile virus outbreak of 2010. *Infection, Genetics and Evolution*, 16, 218–225.

Gonzalez, G., & Troncoso, P. (2007) The Fruit Fly Exclusion Programme in Chile. M.J.B. Vreysen, A.S. Robinson and J. Hendrichs (eds.), *Area-Wide Control of Insect Pests*, 641 – 651.

Gonzalez, D., Gordh G., Thompson, S.N., & Adler, J. (1979) Biotype discrimination and its importance to biological control. In *Genetics in Relation to Insect Management* (Edited by Hoy M. A. and McKelvey Jr. J. J.), Rockefeller Foundation, New York.

Goodman, H., Egizi, A., Fonseca, D.M., Leisnham, P.T., & LaDeau, S.L. (2018) Primary blood-hosts of mosquitoes are influenced by social and ecological conditions in a complex urban landscape. *Parasitology & Vectors*, 11, 218.

Gordadze, A.V., Korochkina, S.E., Zakharkin, S.O., Norton, A.L., & Benes, H. (1999) Molecular cloning and expression of two hexamerin cDNAs from the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*, 8, 55–66.

Gossner, C.M., Ducheyne, E., & Francis Schaffner (2018) Increased risk for autochthonous vector-borne infections transmitted by *Aedes albopictus* in continental Europe. *Euro Surveillance*, 23, 1800268.

Grard, G., Caron, M., Mombo, I.M., Nkoghe, D., Mboui, Ondo, S.M., Jiolle, D., Fontenille, D., Paupy, C., & Leroy, E.M. (2014) Zika virus in Gabon (Central Africa) 2007: a new threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8, e2681.

Gratz, N.G. (2004) Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Medical Veterinary Entomology*, 18, 215-27.

Gratz, N.G. (2006) *Vector- and Rodent-Borne Diseases in Europe and North America*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press.

Gray, E.M., & Bradley T.J. (2005) Physiology of desiccation resistance in *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis*, American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 73, 553-559.

Grech, M. G., Sartor, P. D., Almirón, W. R., & Ludueña-Almeida, F. F. (2015) Effect of temperature on life history traits during immature development of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Córdoba city, Argentina. Acta Tropica, 146, 1–6.

Green, B.S., & McCormick, M.I. (2005) Maternal and paternal influences determine size, growth and performance in a tropical reef fish larvae. Marine Ecology Progress Series, 289, 263-272.

Grimstad, P.R., & Walker, E.D. (1991) *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae) and La Crosse Virus. IV. Nutritional Deprivation of Larvae Affects the Adult Barriers to Infection and Transmission. Journal of Medical Entomology, 28, 378–386.

Gubler, D. (1970) Comparison of reproductive potentials of *Aedes* (Stegomyia) *albopictus* Skuse and *Aedes* (Stegomyia) *polynesiensis* Marks. Mosquito News 30, 201–209.

Guidi, V., Lehner, A., Lüthy, P., & Tonolla, M. (2013) Dynamics of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Lysinibacillus sphaericus* Spores in Urban Catch Basins after Simultaneous Application against Mosquito Larvae. PLoS ONE, 8, e55658.

Günay, F., Alten, B., Simsek, F., Aldemir, A., & Linton, Y.-M. (2015) Barcoding Turkish *Culex* mosquitoes to facilitate arbovirus vector incrimination studies reveals hidden diversity and new potential vectors. Acta Tropica, 143, 112–120.

Gwadz, R.W., Craig, G.B. Jr., & Hickey, W.A. (1971) Female sexual behavior as the mechanism rendering *Aedes aegypti* refractory to insemination. Biology Bulletin, 140, 201–214.

H

Hamama, H. M., Zyaan, O. H., Abu Ali, O. A., Saleh, D. I., Elakkad, H. A., El-

Saadony, M. T., & Farag, S. M. (2021). Virulence of entomopathogenic fungi against *Culex pipiens*: Impact on biomolecules availability and life table parameters. Saudi Journal of Biological Sciences.

Hansen, I.A., Attardo, G.M., Roy, S.G., & Raikhel, A.S. (2005) Target of rapamycin-dependent activation of S6 kinase is a central step in the transduction of nutritional signals during egg development in a mosquito. Journal of Biological Chemistry, 280, 20565–72.

Hannon, G.J. (2002) RNA interference. Nature, 418: 244–251.

Hanson, S.M., & Craig, G.B. Jr. (1994) Cold acclimation, diapause, and geographic origin affect cold hardiness in eggs of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology, 31, 192-201.

Hajra, A., Bandyopadhyay, D., & Hajra, S.K. (2016) Zika virus: a global threat to humanity: a comprehensive review and current developments. North American Journal of Medicine Science, 8, 123–8.

Haramis, L.D. (1985) Larval nutrition, adult body size, and the biology of *Aedes triseriatus*. Ecology of Mosquitoes: Proceedings of a Workshop (ed. by L. P. Lounibos, J. R. Rey & J. H. Frank), 431–437. Florida Medical Entomology Laboratory Vero Beach, FL.

Harbach, R. (2007) The Culicidae (Diptera): A Review Of Taxonomy, Classification And Phylogeny. Zootaxa, 1668, 591-638.

Harbach, R.E., & Kitching, I.J. (1998) Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). Systematic Entomology, 23, 327–370.

Harbach, R.E. (2012) *Culex pipiens*: Species versus species complex – Taxonomic history and perspective. Journal of the American Mosquito Control Association, 28, 10-23.

Harburguer, L., Seccacini, E., Licastro, S., Zerba, E., & Masuh, H. (2012) Droplet size and efficacy of an adulticide-larvicide ultralow-volume formulation on *Aedes aegypti* using different solvents and spray application methods. Pest Management Science, 68, 137–141.

Harris, M.K. (1975) Allopatric resistance: Searching for sources of insect resistance for use in agriculture. *Environ. Ent.* 4, 661-669.

Harris, A.F., Nimmo, D., McKemey, A.R., Kelly, N., Scaife, S., Donnelly, C.A., Beech, C., Petrie, W.D., & Alphey, L. (2011) Field performance of engineered male mosquitoes. *Nature Biotechnology*, 29, 1034–1037.

Harrington, L.C., Edman, J.D., & Scott, T.W. (2001) Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? *Journal of Medical Entomology*, 38, 411–422.

Hawley, W.A. (1985) A High-Fecundity Aedine: Factors Affecting Egg Production of the Western Treehole Mosquito, *Aedes sierrensis* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 22, 220–225.

Hawley, W.A., Pumpuni, C.B., Brady, R.H., & Craig, G.B. Jr. (1989) Overwintering survival of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) eggs in Indiana. *Journal of Medical Entomology*, 26, 122-129.

Hayward, S.A.L., Rinehart, J.P., & Denlinger, D.L. (2004) Desiccation and rehydration elicit distinct heat shock protein transcript responses in flesh fly pupae. *Journal of Experimental Biology*, 207, 963–971.

Hayes, E.B., Komar, N., Nasci, R.S., Montgomery, S.P., O'Leary, D.R., & Campbell, G.L. (2005) Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerging Infectious Diseases*, 11, 1167-1173.

Haynes, J.W., and Smith, J.W. (1992) Competitiveness of boll weevils (Coleoptera: Curculionidae) sterilized with low doses of fractionated irradiation. *Journal of Entomological Science*, 27, 421-426.

Hecht, O. (1932) Experimentelle beitrage zur biologie der stechmu € " cken II. *Z. Angew. Entomology*, 19, 579–607.

Helinski, M.E.H., Deewatthanawong, P., Sirot, L.K., Wolfner, M.F., & Harrington, L.C. (2012) Duration and dose-dependency of female sexual receptivity responses to seminal fluid proteins in *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* mosquitoes. *Journal of Insect Physiology*, 58, 1307–1313.

Helinski, M.E.H., & Harrington, L.C. (2011) Male mating history and body size

influence female fecundity and longevity of the dengue vector *Aedes aegypti*. Journal of Medical Entomology, 48, 202–211.

Helinski, M.E.H., Hassan, M.M., El-Motasim, W.M., Malcolm, C.A., Knols, B.G.J., & El-Sayed, B. (2008) Towards a Sterile Insect Technique field release E.A., Ryan, P.A., Ritchie, S.A., Turelli, M., & O'Neill, S.L. (2011) Successful

of *Anopheles arabiensis* mosquitoes in Sudan: Irradiation, transportation, and field cage experimentation. Malaria Journal, 7, 65.

Hellenic Center for Disease Control & Prevention (2015) Epidemiological surveillance report, malaria in Greece, 1-7, <https://eody.gov.gr/wp>

Hellenic Centre for Disease Control and Prevention (2018) Weekly epidemiological report for West Nile Virus disease in Greece, HCDCP, Athens, Greece

Hertig, M., & Wolbach, S. B. (1924) Wolbach (1924) Studies on Rickettsia-Like Micro- Organisms in Insects. The Journal of Medical Research, 44, 329–374.

Hertlein, M.B., Mavrotas, C., Jousseau, C., Lysandrou, M., Thompson, G.D., Jany, W., & Ritchie, S.A. (2010) A Review of Spinosad as a Natural Product for Larval Mosquito Control. Journal of the American Mosquito Control Association, 26, 67–87.

Hesson, J.C., Rettich, F., Merdić, E., Vignjević, G., Östman, Ö., Schäfer, M., Foussadier, R., Besnard, G., Medlock, J., Scholte, E-J., & Lundström, J.O. (2014) The arbovirus vector *Culex torrentium* is more prevalent than *Culex pipiens* in northern and central Europe. Medical and Veterinary Entomology, 28, 179-86.

Hien, D.S. (1975) Biology of *Aedes aegypti* (L., 1762) and *Aedes albopictus* (Skuse 1895) (Diptera, Culcidae). II. Effect of environmental conditions on the hatching of larvae. Acta Parasitologica Polonica, 23, 537-552.

Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A., & Werren, J. H. (2008) How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analysis of current data. FEMS Microbiology Letters, 281, 215–220.

Hiss, E.A., & Fuchs, M.S. (1972) The effect of matrone on oviposition in the mosquito, *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*, 18, 2217–2227.

Hoffmann, A. A., Montgomery, B. L., Popovici, J., Iturbe-Ormaetxe, I., Johnson, P. H., Muzzi, F., Greenfield, M., Durkan, M., Leong, Y.S., Dong, Y., Cook, H., Axford, J., Callahan, A.G., Kenny, N., Omodei, C., McGraw, E.A., Ryan, P.A., Ritchie, S.A., Turelli, M., & O' Neill, L. O. (2011) Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature*, 476, 454–457.

Hoffmann, A.A., Shirriffs, J., & Scott, M. (2005) Relative importance of plastic vs genetic factors in adaptive differentiation: geographical variation for stress resistance in *Drosophila melanogaster* from eastern Australia *Functional Ecology*, 19, 222-227.

Honório, N.A., Nogueira, R.M.R., Codeço, C.T., Carvalho, M.S., Cruz, O.G., de Avelar Figueiredo Mafra Magalhães M, de Araújo, J.M.G., de Araújo, E.S.M., Gomes, M.Q., Pinheiro, L.S., da Silva Pinel, C., & Lourenço-de-Oliveirae, R. (2009) Spatial Evaluation and Modeling of Dengue Seroprevalence and Vector Density in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3, e545.

Hooper, G.H.S. (1970) Sterilization of the Mediterranean fruit fly: a review of laboratory data, pp. 3-12 In *Sterile-Male Technique for Control of Fruit Flies*. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria

Hooper, G.H.S., & Katiyar, K.P. (1971) Competitiveness of gamma-sterilized males of the Mediterranean fruit fly. *Journal of Economic Entomology*, 64, 1068-1071.

Hooper, G.H.S. (1972) Sterilization of the Mediterranean fruit fly with gamma radiation: effect on male competitiveness and change in fertility of females alternately mated with irradiated and untreated males. *Journal of Economic Entomology*, 65, 1-6.

Hooper, G.H.S. (1975) Sterilization of *Dacus Cucumis* French (Diptera: Tephritidae) by gamma radiation. I. Effect of dose on fertility, survival and competitiveness. *Journal of Australian Entomology Society*, 14,81-87.

Huff, C.G. (1929) Ovulation requirements of *Culex pipiens* Linn. Biology Bulletin, 56, 347–350.

Huang, S., Hamer, G.L., Molaei, G., Walker, E.D., Goldberg, T.L., Kitron, U.D., & Andreadis, T.G. (2009) Genetic Variation Associated with Mammalian Feeding in *Culex pipiens* from a West Nile Virus Epidemic Region in Chicago, Illinois. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 9, 637- 42.

Huijben, S., Schaftenaar, W., Wijsman, A., Paaijmans, K.P., & Takken, W. (2007) Avian malaria in Europe: an emerging infectious disease? In: Takken, W., Knols, B.G. (eds) Emerging pests and vector-borne diseases in Europe. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Netherlands, 59–74.

I

Ikeshoji, T., & Mulla, M.S. (1970) Overcrowding factors of mosquito larvae. 2. Growth retarding and bacteriostatic effects of the overcrowding factors of mosquito larvae. Journal of Economic Entomology, 63, 1737-1743.

Invasive Species Specialist Group (2009) Global Invasive Species Database – *Aedes albopictus* Available
<http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?si=109&fr=1&sts=sss&lang=EN>

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.

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.

Itoh, T. (1994) Utilization of blood-fed females of *Aedes aegypti* as a vehicle for the transfer of the insect growth regulator, pyriproxyfen, to larval habitats. Tropical Medicine, 36, 243–8.

Iturbe-Ormaetxe, I., Walker, T., & O' Neill, S. L. (2011). *Wolbachia* and the
[279]

biological control of mosquito-borne disease. EMBO Reports, 12, 508–518.

J

Jacups, S.P., Rapley, L.P., Johnson, P.H., Benjamin, S., & Ritchie, S.A. (2013) *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* misting for control of *Aedes* in cryptic ground containers in North Queensland, Australia. American Journal of Tropical Medicine Hygiene, 88, 490–496.

James, S., Takken, W., Collins, F. H., & Gottlieb, M. (2013) Perspective piece: needs for monitoring mosquito transmission of malaria in a pre-elimination world. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 90, 6–10.

Jansen, C.C., & Beebe, N.W. (2010) The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next? Microbes Infect. 12, 272–9.

Jeyaprakash, A., & Hoy, M.A. (2000) Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. Insect Molecular Biology, 9, 393–405.

Jobling, B. (1938) On two subspecies of *Culex pipiens* L. (Diptera). Transactions of the Entomological Society of London, 87, 193–216.

Johnson, B. J., & Fonseca, D. M. (2014). The effects of forced-egg retention on the blood-feeding behavior and reproductive potential of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). Journal of Insect Physiology, 66, 53–58.

Jones, M.D.R. (1981) The programming of circadian flight-activity in relation to mating and the gonotrophic cycle in the mosquito, *Aedes aegypti*. Physiological Entomology, 6, 307–313.

Jones, M.D.R., & Gubbins, S.J. (1978) Changes in the circadian flight activity of the mosquito *Anopheles gambiae* in relation to insemination, feeding and oviposition. Physiological Entomology, 3, 213–220.

Jones, M.D.R., & Gubbins, S.J. (1979) Modification of female circadian flight-activity by a male accessory gland pheromone in the mosquito, *Culex pipiens quinquefasciatus*. Physiological Entomology, 4, 345–351.

Jong, Z.-W., Faeza, N., Kassim, A., Aiman Naziri, M., & Webb, C.E. (2016) The Effect of inbreeding and larval feeding regime on immature development of *Aedes albopictus*. *Journal of Vector Ecology*, 42, 105–112.

Joyeux, C. (1918) Note sur les Culicides de Macedoine. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 11, 530- 547.

Judson, C.L. (1976) Feeding and oviposition behavior in the mosquito *Aedes aegypti* (L.). I. Preliminary studies of physiological control mechanisms. *Biology Bulletin*, 133, 369–377.

Juliano, S.A., & Lounibos, P.L. (2005) Ecology of invasive mosquitoes: effects on resident species and on human health. *Ecology Letters*, 8, 558–574.

Juliano, S.A., Lounibos, L.P., & O'Meara, G.F. (2004) A field test for competitive effects of *Aedes albopictus* on *Ae. aegypti* in South Florida: differences between sites of coexistence and exclusion? *Oecologia*. 139, 583–593.

K

Kaiser, A., Jerrentrup, H., Samamdou-Voyadjoglou, A., & Becker, N. (2001) Contribution to the distribution of European mosquitoes (Diptera: Culicidae): four new country records from northern Greece. *European Mosquito Bulletin*, 10, 9-12.

Kampen, H., Kronefeld, M., Zielke, D., & Werner, D. (2013) Further specimens of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) trapped in southwest Germany, *Parasitology Research*, 112, 905-7.

Kampen, H., & Werner, D. (2014) Out of the bush: the Asian bush mosquito *Aedes japonicus* (Theobald, 1901) (Diptera, Culicidae) becomes invasive. *Parasites & Vectors*, 7, 59-10.

Kapranas, A., Collatz, C.J., Michaelakis, M.A., & Milonas, M.P. (2022) Review of the role of sterile insect technique within biologically-based pest control – An appraisal of existing regulatory frameworks. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 170, 385–393.

Kassim, N.F., Webb, C.E., & Russell, R.C. (2012a) *Culex molestus* Forskal (Diptera: Culicidae) in Australia: colonisation, stenogamy, autogeny, oviposition and larval development. Australian Journal of Entomology, 51, 67–77.

Kassim, N.F., Webb, C.E., & Russell, R.C. (2012b) Is the expression of autogeny by *Culex molestus* Forskal (Diptera: Culicidae) influenced by larval nutrition or by adult mating, sugar feeding, or blood feeding? Journal of Vector Ecology, 37, 162–171.

Kassim, N.F., Webb, C.E., & Russell, R.C. (2012c) The importance of males: larval diet and adult sugar feeding influences reproduction in *Culex molestus*. Journal American Mosquito Control Association, 28, 312–316.

Katiyar, K.P. (1973a) Insemination capacity of gamma sterilized Mediterranean fruit fly males irradiated during the pupal stage. Turrialba, 23, 48-51.

Katiyar, K. P. (1973b) Mating competitiveness and rate of sexual maturity of gamma-sterile Mediterranean fruit fly males. Turrialba, 23, 216-221.

Kek, R., Hapuarachchi, H. C., Chung, C.-Y., Humaidi, M. B., Razak, M. A. B. A., Chiang, S., Lee, C., Tan, C.-H., Yap, G., Chong, C.H., Lee, K.-S., Ng, L.-C. (2014) Feeding Host Range of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Demonstrates Its Opportunistic Host-Seeking Behavior in Rural Singapore. Journal of Medical Entomology, 51, 880–884.

Kilpatrick, A.M., Kramer, L.D., Campbell, S.R., Alleyne, E.O., Dobson, A.P., & Daszak, P. (2005) West Nile virus risk assessment and the bridge vector paradigm. Emerging Infectious Diseases, 11, 425–429.

Kilpatrick, A.M., Kramer, L.D., Jones, M.J., Marra, P.P., & Daszak, P. (2006) West Nile virus epidemics in North America are driven by shifts in mosquito feeding behavior. PLOS Biology, 4, e82.

Kittayapong, P., Baisley, K. J., Baimai, V., & O'Neill, S. L. (2000) Distribution and Diversity of *Wolbachia* Infections in Southeast Asian Mosquitoes (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology, 37, 340–345.

Kioulos, I., Michaelakis, A., Kioulos, N., Samanidou-Voyadjoglou, A.,

Koliopoulos, G. (2014) Mosquito (Diptera: Culicidae) fauna in natural breeding sites of Attica basin, Greece. *Hellenic Plant Protection Journal*, 7, 31–34.

Klassen, W., & Curtis, F. (2005) History of the sterile insect technique. In: *Sterile Insect Technique* (ed. By V. A. Dyck, J. Hendrichs & A. S. Robinson), Springer, Dordrecht, The Netherlands, 3-36.

Klassen, W., Curtis, C.F., & Hendrichs, J. (2020) History of the Sterile Insect Technique. In *Sterile Insect Technique*; CRC Press: Boca Raton, F.L., USA.

Kline, D.L. (2007) Semiochemicals, traps/targets and mass trapping technology for mosquito management. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23, 241–251.

Klowden, M.J. (1993) Mating and nutritional state affect the reproduction of *Aedes albopictus* mosquitoes. *Journal of American Mosquito Control Association*, 9, 169–173.

Klowden, M.J. (1999) The check is in the male: Male mosquitoes affect female physiology and behavior. *Journal of American Mosquito Control Association*, 15, 213–220.

Klowden, M.J., & Chambers, G.M. (1991) Male accessory gland substances activate egg development in nutritionally stressed *Aedes aegypti* mosquitoes. *Journal of Insect Physiology*, 37, 721–726.

Knipling, E.F. (1955) Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *Journal of Economic Entomology*, 48, 459–462.

Knipling, E.F. (1979) Agriculture Handbook No.512. In *The Basic Principles of Insect Population Suppression and Management*; U.S. Government Printing Office: Washington, DC, USA.

Knipling, E.F. (1998) Role of parasitoid augmentation and Sterile Insect Techniques in areawide management of agricultural insect pests. *Journal of Agricultural Entomology*, 15(4): 273–301.

Kobayashi, M., Nihei, N., & Kurihara, T. (2002) Analysis of northern distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Japan by geographical information system. *Journal of Medical Entomology*, 39, 4–11.

Kolimenakis, A., Heinz, S., Wilson M.L., Winkler, V., Yakob, L., Michaelakis, A. Papachristos, D., Richardson, C., & Horstick, O. (2021) The role of urbanisation in the spread of *Aedes* mosquitoes and the diseases they transmit-A systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9, 15(9).

Kostal, V., Vambera, J., & Bastl, J. (2004) On the nature of pre-freeze mortality in insects: water balance, ion homeostasis and energy charge in the adults of *Pyrrhocoris apterus*. *Journal of Experimental Biology*, 207, 1509-1521.

Kotsakiozi, P., Gloria-Soria, A., Caccone, A., Evans, B., Schama, R., Martins, A.J., & Powell, J. R. (2017) Tracking the return of *Aedes aegypti* to Brazil, the major vector of the dengue, chikungunya and Zika viruses. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11, e0005653.

Krafsur, E.S. (1998) Sterile Insect Technique for suppressing and eradicating insect population: 55 Years and Counting. *Journal of Agricultural and Urban Urban Entomology*, 15, 303–317.

Kraemer, M.U., Sinka, M.E., Duda, K.A., Mylne, A.Q., Shearer, F.M., Barker, C.M., Moore, C.G., Carvalho, R.G., Coelho, G.E., Van Bortel, W., Hendrickx, G., Schaffner, F., Elyazar, I.R.F., Teng, H-J., Brady, O.J., Messina, J.P., Pigott, D.M., Scott, T.W., Smith, D.L., Wint, G.R.W., Golding, N., & Hay, S.I., (2015) The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *eLife*, 4, e08347.

Krüger, A., Börstler, J., Badusche, M., Lühken, R., Garms, R., & Tannich, E. (2014) Mosquitoes (Diptera: Culicidae) of metropolitan Hamburg, Germany. *Parasitology Research*, 113, 907–2914.

Kuba, H., T. Kohama, H. Kakinohana, M. Yamagishi, K. Kinjo, Y. Sokei, T. Nakasone, & Y. Nakamoto (1996) The successful eradication programs of the melon fly in Okinawa. In *Fruit Fly Pests: A World Assessment of Their Biology and Management* (B. A. McPherson and G. J. Steck eds.). St. Lucie Press, Delray Beach, Florida, U.S.A., 543–550.

Kythreoti, G., Sdralia, N., Tsitoura, P., Papachristos, D.P., Michaelakis, A., Karras, V., Ruel, D.M., Yakir, E., Bohbot, J.D., Schulz, S., & Iatrou, K. (2021) Volatile allosteric antagonists of mosquito odorant receptors inhibit human-host

attraction. Journal of Biological Chemistry, 296, 100172.

L

Lachenicht, M.W., Clusella-Trullas, S., Boardman, L., Le Roux, C., & Terblanche, J.S. (2010) Effects of acclimation temperature on thermal tolerance, locomotion performance and respiratory metabolism in *Acheta domesticus* L. (Orthoptera: Gryllidae). Journal of Insect Physiology, 56, 822–830.

Laird M. (1998) The natural history of larval mosquito habitats. Academic Press, London. Uk, 555.

L'Ambert, G., Ferré, J.-B., Schaffner, F., & Fontenille, D. (2012) Comparison of different trapping methods for surveillance of mosquito vectors of West Nile Virus in Rhône Delta, France. Journal of Vector Ecology, 37, 269-75.

Laven, H. (1967) Eradication of *Culex pipiens fatigans* through Cytoplasmic Incompatibility. Nature, 216, 383–384.

Leahy, M.G., & Craig, G.B. Jr. (1965) Accessory gland substance as a stimulant for oviposition in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. Mosquito News, 25, 448–452.

League, G.P., Baxter, L.L., Wolfner, M.F., & Harrington, L.C. (2019) Male accessory gland molecules inhibit harmonic convergence in the mosquito *Aedes aegypti*. Current Biology. 29, 196–197.

Lee, K.-S., & Lee-Ching, N.G. (2014) Feeding Host Range of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Demonstrates Its Opportunistic Host-Seeking Behavior in Rural Singapore. Journal of Medical Entomology, 51, 880–884.

Lee Y., Meneses C.R., Fofana A., & Lanzaro G.C. (2009) Desiccation resistance among subpopulations of *Anopheles gambiae* s.s. from Selinkenyi, Mali. Journal of Medical Entomology, 46, 316-320.

Lees, R.S., Carvalho, D.O., & Bouyer, J. (2020) Potential impact of integrating the Sterile Insect Technique into the fight against dis-ease-transmitting mosquitoes. In Sterile Insect Technique; CRC Press: Boca Raton, FL, USA.

Legendre, J. (1931) Le moustique cavernicole ou l'adaptation de "Culex pipiens" a l'urbanisme moderne. Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine, 106, 86–89.

Leisnham, P.T., Lounibos, L.P., O'Meara, G.F., & Juliano, S.A. (2009) Interpopulation divergence in competitive interactions of the mosquito *Aedes albopictus*. Ecology, 90, 2405–2413.

Leinsham, P.T., Sala, L.M., & Juliano, S.A. (2014) Geographic variation in adult survival and reproductive tactics of the mosquito *Aedes albopictus*. Journal of Medical Entomology, 45, 210–221.

Lequime, S., Dehecq, J.-S., Matheus, S., de Laval, F., Almeras, L., Briolant, S., & Fontaine, A. (2020) Modeling intra-mosquito dynamics of Zika virus and its dose-dependence confirms the low epidemic potential of *Aedes albopictus*. PLoS Pathogens, 16,12.

Levi, T., Ben-Dov, E., Shahi, P., Borovsky, D., & Zaritsky, A. (2014) Growth and development of *Aedes aegypti* larvae at limiting food concentrations. Acta Tropica, 133, 42–44.

Livadas, G.A. (1958) Malaria eradication in Greece. Rivista di Malariologia, 37, 173e91.

Li, Y., Kamara, F., Zhou, G., Puthiyakunnon, S., Li, C., Liu, Y., Zhou, Y., Yao, L., Yan, G., & Chen, X.-G. (2014) Urbanization Increases *Aedes albopictus* Larval Habitats and Accelerates Mosquito Development and Survivorship. PLoS Neglected Tropical Diseases, 8, e3301.

Li, Y., Zhang, M., Wang, X., Zheng, X., Hu, Z., & Xi, Z. (2021) Quality control of long-term mass-reared *Aedes albopictus* for population suppression. Journal of Pest Science, 94, 1531–1542.

Liles, J.N. (1965) Effects of mating or association of the sexes on longevity in *Aedes aegypti* (L.). Mosquito News, 25, 434-439.

Liles, J.N., & DeLong, D.N. (1960) The Longevity and Productivity of Adult Male and Female *Aedes Aegypti* When Reared Separately and Together on Three Different Diets. Annals of the Entomological Society of America, 53, 277– 280

Lindenbach, B.D. (2001) Flaviviridae: The viruses and their replication. In: [286]

Knipe, D.M. and Howley P.M., Eds., Fields Virology, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 991-1041.

Lindquist, D. A., Abusowa, M., & Hall, M. J. R. (1992) The New World screwworm fly in Libya: a review of its introduction and eradication. Medical and Veterinary Entomology, 1, 2–8.

Linke, S., Niedrig, M., Kaiser, A., Ellerbrok, H., Muller, K., Muller, T., Conraths, F.J., Muhle, R.U., Schmidt, D., Koppen, U., Bairlein, F., Berthold, P., & Pauli, G. (2007) Serologic evidence of West Nile virus infections in wild birds captured in Germany. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 77, 358–364.

Linton. Y-M., Smith, L., & Harback, R.E. (2002) Observations on the taxonomic status of *Anopheles subalpinus* Hackett & Lewis and *Anopheles melanoon* Hackett. European Mosquito Bulletin. 13, 1-7.

Lofgren C. S., Dame D. A., Breeland S. G., Weidhaas D. E., Jeffery G., Kaiser R., Ford H. R., Boston M. D., & Baldwin K. F. (1974) Release of chemosterilized males for the control of *Anopheles albimanus* in El Salvador. Field methods and population control. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 23, 288-97.

Lombardo, F., Salvemini, M., Fiorillo, C., Nolan, T., Zwiebel, L.J., Ribeiro, J.M., & Arcà, B. (2017) Deciphering the olfactory repertoire of the tiger mosquito *Aedes albopictus*. BMC Genomics, 18, 1–23.

Long, C. A., & Zavala, F. (2016) Malaria vaccines and human immune responses. Current Opinion in Microbiology, 32, 96–102.

Lopez-Martinez, G., Benoit, J.B., Rinehart, J.P., Elnitsky, M.A., Lee, R.E. Jr., & Denlinger, D.L. (2009) Dehydration, rehydration and overhydration alter patterns of gene expression in the Antarctic midge, *Belgica antarctica*. Journal of Comparative Physiology B., 179, 481–491.

Lorenz, C., Marques, T., Sallum, M.A., & Suesdek, L (2012) Morphometrical diagnosis of the malaria vectors *Anopheles cruzii*, *Anopheles homunculus* and *Anopheles bellator*. Parasit Vectors. Parasites & Vectors, 5, 257.

Loubinos, L.P. (1994) Variable egg development among *Anopheles* (*Nyssorhynchus*): control by mating? Physiological Entomology, 19, 51–57.

[287]

Loubinos, L.P. (2002) Invasions by insect vectors of human disease. *Annual Revision Entomology*, 47, 233–266.

Lounibos, L.P., Van Dover, C., & O'Meara, G.F. (1982) Fecundity, autogeny, and the larval environment of the pitcher-plant mosquito, *Wyeomyia smithii*. *Oecologia*, 55, 160–164.

Lozano-Fuentes, S. T., Kenney, J.N., Varnado, W., Byrd, B.D., Burkhalter, K.L., & Savage, H.M. (2019) Susceptibility and vectorial capacity of American *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to American Zika virus strains. *Journal of Medical Entomology*, 56, 233–240.

Luca, M., & Rosà, R. (2015) Understanding West Nile Virus ecology in Europe: *Culex pipiens* host feeding preference in a hotspot of virus emergence. *Parasites & Vectors*, 8, 213.

Lux, S.A., Vilardi, J.C., Liedo, P., Gaggi, K., Calcagno, G.E., Munyiri, F.N., Vera, M.T., & Manso, F. (2002) Effects of irradiation on the courtship behavior of medfly (Diptera: Tephritidae) mass reared for the Sterile Insect Technique. *Florida Entomology*, 85, 102–112.

Luz, P.M., Codeço, C.T., Massad, E., & Struchiner, C.J. (2003) Uncertainties regarding dengue modeling in Rio de Janeiro, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 98, 871–878.

Lyimo, I.N., Keegan, S.P., Ranford – Cartwright, L.C., & Ferguson, H.M. (2012) The impact of uniform and mixed species blood meals on the fitness of the mosquito vector *Anopheles gambiae* ss: does a specialist pay for diversifying its host species diet? *Journal of Evolutionary Biology*, 25, 452–460.

M

Mackay, A.J., Amador, M., & Barrera, R. (2013) An improved autocidal gravid ovitrap for the control and surveillance of *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*, 6, 225.

Madakacherry, O., Lees, R.S., & Gilles, J.R.L. (2014) *Aedes albopictus*

(Skuse) males in laboratory and semi-field cages: Release ratios and mating competitiveness. *Acta Tropica*, 132, 124–129.

Madon, M.B., Mulla, M.S., Shaw, M.W., Kluh, S., & Hazelrigg, J.E. (2002) Introduction of *Aedes albopictus* (Skuse) in southern California and potential for its establishment. *Journal of Vector Ecology*, 27, 149-54.

Malcolm, C.A., El Sayed, B., Babiker, A., Girod, R., Fontenille, D., Knols, B.G.J., Nugad, A.H., & Benedict, M.Q. (2009) Field site selection: getting it right first time around. *Malaria Journal*, 8, 9.

Manorenjitha, M.S., & Zairi, J. (2012) Nutrition and overcrowding effects on larval development and fecundity of female *Aedes albopictus* (Skuse). *International Journal of Life Science and Medical Research*, 2, 63-67.

Marina, C.F., Bond, J.B., Muñoz, J., Valle, J., Novelo-Gutiérrez, R., & Williams, T. (2014) Efficacy and non-target impact of spinosad, Bti and temephos larvicides for control of *Anopheles* spp. in an endemic malaria region of southern Mexico. *Parasites & Vectors*, 7, 55.

Marka, A., Diamantidis, A., Papa, A., Valiakos, G., Chaintoutis, S., Doukas, D., Tserkezou, P., Giannakopoulos, A., Papaspyropoulos, K., Patsoula, E., Badieritakis, E., Baka, A., Tseroni, M., Pervanidou, D., Papadopoulos, N.T., Koliopoulos, G., Tontis, D., Dovas, C.I., Billinis, C., Tsakris, A., Kremastinou, J., & Hadjichristodoulou, C. (2013) West Nile Virus State of the Art Report of MALWEST Project. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10, 6534–6610.

Marshall, J.F. (1944) The morphology and biology of *Culex molestus* observational notes for investigators. *British Mosquito Control Institute*, 34, 1-14.

Marten, G.G., & Reid, J.W. (2007) *Cyclopoid copepods*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23, 65–92.

Martina, B., Koraka, P., & Osterhaus, A. (2009) Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clinical Microbiology Reviews* 22, 564–581.

Martinet, J.-P., Ferté, H., Failloux, A.-B., Schaffner, F., & Depaquit, J. (2019)

Mosquitoes of north-western Europe as potential vectors of arboviruses: A review *Viruses*, 11, 1059.

Mastronikolos, D. G., Kapranas, A., Balatsos, G.K., Ioannou, C., Papachristos, D.P., Milonas, P.G., Puggioli, A., Pajović, I., Petrić, D., Bellini, R., Michaelakis, A., & Papadopoulos, N.T. (2022) Quality Control Methods for *Aedes albopictus* Sterile Male Transportation. *Insects*, 13, 179.

Mattingly, P.F. (1951) The *Culex pipiens* complex. Transactions of the Entomological Society of London, 102, 331–382.

Mavridis, K., Fotakis, E.A., Kioulos, I., Mpellou, S., Konstantas, S., Varela, E., Gewehr, S., Diamantopoulos, V., & Vontas, J. (2018) Detection of West Nile virus—Lineage 2 in *Culex pipiens* mosquitoes, associated with disease outbreak in Greece. *Acta Tropical*, 182, 64–68.

Maxwell, F.G. (1972) Host plant resistance to insects-nutritional and pest management relationships. Pages 599-690 in: *Insect and Mite Nutrition*. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.

Mboera, L.E.G., Knols, B.G.J., Takken, W., & Della Torre, A. (1997) The response of *Anopheles gambiae* s.l. and *Anopheles funestus* (Diptera:Culicidae) to tents baited with human odour or carbon dioxide in Tanzania. *Bulletin of Entomological Research*, 87, 173-178.

Mboera, L. E. G., Takken, W., & Sambu, E. Z. (2000) The response of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to traps baited with carbon dioxide, 1-octen-3-ol, acetone, butyric acid and human foot odour in Tanzania. *Bulletin of Entomological Research*, 90, 155-9.

McBride, C.S., Baier, F., Omondi, A.B., Spitzer, S.A., Lutomia, J., Sang, R., Ignell, R., & Vosshall, L.B. (2014) Evolution of mosquito preference for humans linked to an odorant receptor. *Nature*, 515, 222–227.

McCormick, M.I., & Gagliano, M. (2008) Carry-over effects - the importance of a good start. Proceedings of the 11th International Coral Reef Symposium, Ft. Lauderdale, Florida, 10.

MacDonald, G. (1957) The Epidemiology and Control of Malaria. Oxford:

Oxford University Press, 201.

McGraw, E.A., & O'Neill, S.L. (2013) Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 181–193.

McIntyre, N.E. (2000) Ecology of Urban Arthropods: A Review and a Call to Action. *Annals of the Entomological Society of America*, 93, 825–835.

McMeniman, C.J., Lane, R.V., Cass, B.N., Fong, A.W.C., Sidhu, M., Wang, Y.-F., & O'Neill, S.L. (2009) Stable Introduction of a Life-Shortening *Wolbachia* Infection into the Mosquito *Aedes aegypti*. *Science*, 323, 141–144.

Medeiros-Sousa, A.R., Ceretti, W., Urbinatti, P.R., de Carvalho, G.C., de Paula, M.B., Fernandes, A., Matos, M.O., Orico L.D., Araujo A.B., Nardi, M.S., & Marelli, M.T. (2013) Mosquito fauna in municipal parks of São Paulo City, Brazil: a preliminary survey. *Journal of American Mosquito Control Association*, 29, 275–9.

Medici, A., Carrieri, M., Scholte, E.J., Maccagnani, B., Dindo, M.L., & Bellini, R. (2011) Studies on *Aedes albopictus* larval mass-rearing optimization. *Journal of Economic Entomology*, 104, 266–273.

Medlock, J.M., Hansford, K.M., Schaffner, F., Versteirt, V., Guy Hendrickx, Zeller, H., & Bortel, W.V. (2012) A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks, and control options. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12, 435–47.

Medlock, J.M., & Leach, S. A. (2015) Effect of climate change on vector-borne disease risk in the UK. *Lancet Infectious Diseases*, 15, 721–30.

Medlock, J. M., Avenell, D., Barrass, I., & Leach, S. (2006) Analysis of the potential for survival and seasonal activity of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in the United Kingdom. *Journal of Vector Ecology*, 31, 292–304.

Mendis, K. N., David, P. H., & Carter, R. (1990) Human immune responses against sexual stages of malaria parasites: Considerations for malaria vaccines. *International Journal for Parasitology*, 20, 497–502.

Mihou, A.P., & Michaelakis, A. (2010) Oviposition aggregation pheromone for *Culex* mosquitoes: bioactivity and synthetic approaches. *Hellenic Plant*
[291]

Protection Journal, 3, 33 – 35.

Mitchell, C.J., & Briegel, H. (1989) Inability of diapausing *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) to use blood for producing lipid reserves for overwinter survival. *Journal of Medical Entomology*, 26, 318-26.

Mitchell-Foster, K., Ma, B. O., Warsame-Ali, S., Logan, C., Rau, M. E., & Lowenberger, C. (2012) The influence of larval density, food stress, and parasitism on the bionomics of the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): implications for integrated vector management. *Journal of Vector Ecology*, 37, 221–229.

Mohammed, H.A., Coluzzi, M., & Pickett, J.A. (2001) Electroantennogram and behavioural responses of the malaria vector *Anopheles gambiae* to human-specific sweat components. *Medical and Veterinary Entomology*, 15, 259–266.

Mohammed, A., & Chadee, D.D. (2011) Effects of different temperature regimens on the development of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) mosquitoes. *Acta Tropical*, 119, 38–43.

Mogi, M., Armbruster, P.A. & Tuno, N. (2020) Differences in responses to urbanization between invasive mosquitoes, *Aedes japonicus* (Diptera: Culicidae) and *Aedes albopictus*, in their native range, Japan. *Journal of Medical Entomology*, 57, 104–112.

Mogi, M., & Tuno, N. (2014) Impact of climate change on the distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in northern Japan: Retrospective analyses. *Journal of Medical Entomology*, 51, 572–579.

Molaei, G., Andreadis, T.G., Armstrong, P.M., Anderson, J.F., & Vossbrinck, C.R. (2006) Host Feeding Patterns of *Culex* Mosquitoes and West Nile Virus Transmission, Northeastern United States, 12, 468–474.

Monath, T., & Vasconcelos, P. (2015) Yellow fever, *Journal of Clinical Virology*. 64: 160–173.

Montarsi, F., Martini, S., Pont, M.D., Delai, N., Milone, N.F., Mazzucato, M., Soppelsa, F., Cazzola, L., Cazzin, S., Ravagnan, S., Ciocchetta, S., Russo, F., & Capelli, G. (2013) Distribution and habitat characterization of the recently introduced invasive mosquito *Aedes koreicus* [*Hulecoeteomyia koreica*], a new [292]

potential vector and pest in north-eastern Italy. *Parasites & Vectors*, 6, 292

Moorefield, H.H. (1951) Sexual dimorphism in mosquito pupae. *Mosquito News*, 11, 175–177.

Morais, S.A. de, Moratore, C., Suesdek, L., & Marrelli, M.T. (2010) Genetic-morphometric variation in *Culex quinquefasciatus* from Brazil and La Plata, Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105, 672–676.

Mori, A. (1979) Effects of larval density and nutrition on some attributes of immature and adult *Aedes albopictus*. *Tropical Medicine*, 21, 85–103.

Mori, A., & Wada, Y. (1978) The seasonal abundance of *Aedes albopictus* in Nagasaki. *Tropical Medicine*, 20, 29-37.

Mousson, L., Zouache, K., Arias-Goeta, C., Raquin, V., Mavingui, P., & Failloux, A.-B. (2012) The native *Wolbachia* symbionts limit transmission of dengue virus in *Aedes albopictus*. *PLoS Neglected tropical Diseases*, 6, e1989.

Moutoussis, C. (1933) Recherches sur l'Anophelisme et le paludisme en Grece. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 26:583-590.

Moyes, C.L., Vontas, J., Martins, A.J., Ng, L.C., Koou, S.Y., Dusfour, I., Raghavendra, K., Pinto, J., Corbel, V., David, J.-P., Weetman, D. (2017) Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11, e0005625.

Muhammad, N.A.F., Kassim, N.F.A., Majid, A.H.A., Rahman, A.A., Dieng, H., & Avicor, S.W. (2020) Biting rhythm and demographic attributes of *Aedes albopictus* (Skuse) females from different urbanized settings in Penang Island, Malaysia under uncontrolled laboratory conditions. *PLoS ONE* 15, e0241688.

Mulla, M.S. (1995) The future of insect growth-regulators in vector control. *Journal of American Mosquito Control Association*, 11, 269–273.

Müller, G.C., Junnila, A., Schlein, Y. (2010) Effective Control of Adult *Culex pipiens* by Spraying an Attractive Toxic Sugar Bait Solution in the Vegetation Near Larval Habitats. *Journal of Medical Entomology*, 1, 63 – 66.

Mun˜oz, J., Ruiz, S., Soriguer, R., Alcaide, M., Viana DS, Roiz, D., Vázquez, A., & Figuerola, J. (2012) Feeding Patterns of Potential West Nile Virus Vectors in South-West Spain. PLoS ONE, 7, e39549.

Muturi, E.J., Blackshear, Jr. M., & Montgomery, A. (2012) Temperature and density-dependent effects of larval environment on *Aedes aegypti* competence for an alphavirus. Journal of Vector Ecology, 37, 154–61.

N

Naranjo, D.P., Qualls, W.A., Müller, G.C., Samson, D.M., Roque, D., Alimi, T., Arheart, K., Beier, J.C., & Xue, R.-D. (2013) Evaluation of boric acid sugar baits against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in tropical environments. Parasitology Research, 112, 1583–1587.

Nasci, R.S., & Mitchell, C.J. (1994) Larval Diet, Adult Size, and Susceptibility of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to Infection with Ross River Virus. Journal of Medical Entomology, 31, 123–126.

Nasci, R. (1986) Relationship between adult mosquito (Diptera: Culicidae) body size and parity in field populations. Environmental Entomology, 15, 874 – 876.

Naksathit, A.T., Edman, J.D., & Scott, T.W. (1999a) Partitioning of glycogen, lipid, and sugar in ovaries and body remnants of female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) fed human blood. Journal of Medical Entomology, 36, 18-22.

Naksathit, A.T., Edman, J.D., & Scott, T.W. (1999b) Utilization of human blood and sugar as nutrients by female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology, 36, 13-17.

Nelms, B. M., Macedo, P. A., Kothera, L., Savage, H. M., & Reisen, W. K. (2013). Overwintering Biology of *Culex* (Diptera: Culicidae) Mosquitoes in the Sacramento Valley of California. Journal of Medical Entomology, 50, 773–790.

Niclot, A. (1917) L'anophelisme Macedonien dans ses rapports avec paludisme au cours de 1916. Bulletin de la Société de pathologie exotique, 10, 323-328.

Niebylski, M.L., Savage, H.M., Nasci, R.S., & Craig, Jr. G.B. (1994) Blood hosts of *Aedes albopictus* in the United States. *Journal of American Mosquito Control Association* 10, 447–450.

Niehaus, C., Wilson, R.S., Storm, J.J., & Angilletta, M.J. (2012) Fall field crickets did not acclimate to simulated seasonal changes in temperature. *Journal of Comparative Physiology B*, 182, 199-207.

Nielson, M.W., & Don, H. (1974) A new virulent biotype of the spotted alfalfa aphid in Arizona. *Journal of Economic Entomology*, 67, 64-66.

O

Ocampo, C.B., Gonzalez, C., Morales, C.A., Perez, M., Wesson, D., & Apperson, C.S. (2009) Evaluation of community-based strategies for *Aedes aegypti* control inside houses. *Biomedica*, 29, 282–297.

O'Donnell, K., Bixby, M., Morin, K., Bradley, D., & Vaughan, J., (2017) Potential of a Northern population of *Aedes vexans* (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus, *Journal of Medicine Entomology*, 54, 1354–1359.

Ohba, S., Ohashi, K., Pujiyati, E., Higa, Y., Kawada, H., Mito, N., & Takagi, M. (2013) The Effect of Pyriproxyfen as a “Population Growth Regulator” against *Aedes albopictus* under Semi-Field Conditions. *PLoS ONE*, 8, e67045.

Ohtani, T., Mizuno, T., Kouda, A., & Kojima, S. (2015) Seasonal Change of Underground Temperature and the Use of Geothermal in Gifu City, Japan, 1–7. In *Proceedings, World Geothermal Congress, Melbourne, Australia*.

Okanda, F.M., Dao, A., Njiru, B.N., Arija, J., Akelo, H.A., Toure, Y., Odulaja, A., Beier, J.C., Githure, J.I., Yan, G., Gouagna, L.C., Knols, B.G., Killeen, G.F., (2002) Behavioural determinants of gene flow in malaria vector populations: *Anopheles gambiae* males select large females as mates. *Malaria Journal*, 1, 10.

Olet, P., Opiyo, E., Robinson, A., (2002) Sexual receptivity and age in *Glossina pallidipes* Austen (Dipt., Glossinidae). *Journal of Applied Entomology*, 126, 86–91.

Oliva, C.F., Benedict, M.Q., Matilda Collins, C., Baldet, T., Bellini, R., Bossin, H., Bouyer, J., Corbel, V., Facchinelli, L., Fouque, F., Geier, M., Michaelakis, A., Roiz, D., Simard, F., Tur, C., & Gouagna, L.-C. (2021) Sterile Insect Technique (SIT) against *Aedes* species mosquitoes: A roadmap and good practice framework for designing, implementing and evaluating pilot field trials. *Insects*, 12, 191.

Oliva, C.F., Damiens, D., Vreysen, M.J.B., Lemperière, G., & Gilles, J. (2013) Reproductive strategies of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and implications for the Sterile Insect Technique. *PLoS ONE*, 8.

Oliva, C.F., Jacquet, M., Gilles, J., Lemperiere, G., Maquart, P.O., Quilici, S., Schooneman, F., Vreysen, M.J.B., & Boyer, S. (2012) The Sterile Insect Technique for controlling populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) on Reunion Island: Mating vigour of sterilized males. *PLoS ONE*, 7.

O'Meara, G., (2020) Variable expressions of autogeny in three mosquito species. *International Journal of Business Innovation and Research*, 1, 253–261

Omondiet, A.B., Ghaninia, M., Dawit, M., Svensson, T., & Ignell, R. (2019) Age-dependent regulation of host seeking in *Anopheles coluzzii*. *Scientific Reports*, 9, 1-9.

O'Neill, S. L., M. Pettigrew, M., Sinkins, S. P., Braig, H. R., Andreadis, T. G., & Tesh, R. B. (1997) In vitro cultivation of *Wolbachia pipiens* in an *Aedes albopictus* cell line. *Insect Molecular Biology*, 6, 33–39.

Ontario Agency for Health Protection and Promotion (Public Health Ontario) (2014) Vector-borne diseases 2014 summary report. Toronto, ON: Queen's Printer for Ontario.

Onyeka, J.O.A., & Boreham, P.F.L. (1987) Population studies, physiological state and mortality factors of overwintering adult populations of females of *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *Bulletin of Entomological Research*, 77, 99–112.

Osório, H.C., Zé-Zé, L., & Alves, M.J. (2012) Host-Feeding Patterns of *Culex pipiens* and Other Potential Mosquito Vectors (Diptera: Culicidae) of West Nile
[296]

Virus (*Flaviviridae*) Collected in Portugal. *Journal of Medical Entomology*, 49, 717–721.

Otero, M., & Solari, H. G. (2010) Stochastic eco-epidemiological model of dengue disease transmission by *Aedes aegypti* mosquito. *Mathematical Biosciences*, 223, 32–46.

Otranto, D., Dantas-Torres, F., Brianti, E., Traversa, D., Petrić, D., Genchi, C., & Capelli, G. (2013) Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe. *Parasites & Vectors*, 6, 16.

Overgaard, J., Kristensen, T.N., Mitchell, K.A., & Hoffmann, A.A. (2011) Thermal tolerance in widespread and tropical *Drosophila* species: does phenotypic plasticity increase with latitude? *American Naturalist*, 178, 8.

P

Pages, N., Huber, K., Cipriani, M., Chevallier, V., Conraths, F.J., Goffredo, M., & Thomas, B. (2009) Scientific review on mosquitoes and mosquito-borne diseases. EFSA Supporting Publications, 6, 7E.

Pampiglione, S., Rivasi, F., Angeli, G., Boldorini, R., Incensati, R.M., Pastormerlo, M., Pavesi, M., & Ramponi, A. (2001) *Dirofilariasis* due to *Dirofilaria repens* in Italy, an emergent zoonosis: report of 60 new cases. *Histopathology*, 38, 344–54.

Pampiglione, S., Trotti, C.G., & Rivasi, F. (1995) Human *dirofilariasis* due to *Dirofilaria* (*Nochtiella*) *repens*: A review of world literature. *Parassitologia*, 37, 149–93.

Pandazis, G. (1932) The culicid fauna of Greece. *Prakt. Acad. Athens* 7, 170–176.

Pandazis, G. (1935) La fauna des Culicides de Grece. *Acta Inst. Mus. Zool. University of Athens*, 1, 1–27

Papa, A., Papadopoulou, E., Paliwal, R., Kalaitzopoulou, S., Mourelatos, S., & Niedrig, M. (2016) Insect-specific flaviviruses in *Aedes* mosquitoes in Greece. *Archives of Virology*, 161, 2183–2188.

[297]

Papa, A., Tsioka, K., Gewehr, S., Kalaitzopoulou, S., Pappa, S., & Mourelatos, S. (2019) West Nile virus lineage 2 in *Culex* mosquitoes. *Acta Tropical*, 208, 105514.

Papa, A., Xanthopoulou, K., Gewehr, S., & Mourelatos, S. (2011) Detection of West Nile Virus lineage 2 in mosquitoes during a human outbreak in Greece. *Clinical Microbiology and Infection*, 17, 1176-80.

Papa, A., Xanthopoulou, K., Tsioka, A., Kalaitzopoulou, S., & Mourelatos, S., (2013) West Nile virus in mosquitoes in Greece. *Parasitology Research*, 112, 1551–1555.

Papadopoulos, N. T., Liedo, P., Müller, H.-G., Wang, J.-L., Molleman, F., & Carey, J. R. (2010) Cost of reproduction in male medflies: The primacy of sexual courting in extreme longevity reduction. *Journal of Insect Physiology*, 56, 283–287.

Papadopoulos, N.T., Carey, J.R., Ioannou, C.S., Ji, H., Mueller, H.G., Wang, J.L., & Lewis, E.E. (2016) Seasonality of post-capture longevity in a medically important mosquito (*Culex pipiens*). *Frontiers in Ecology and Evolution*, 4, 63.

Parker, A., & Mehta, K. (2007) Sterile Insect Technique: A model for dose optimization for improved Sterile Insect quality. *Florida Entomology*, 90, 88-95.

Partridge, L., Ewing, A., & Chandler, A. (1987) Male size and mating success in *Drosophila melanogaster*: The roles of male and female behaviour. *Animal Behaviour*, 35, 555–562.

Pates, H.V., Takken, W., Stuke, K., & Curtis, C.F. (2001b) Differential behaviour of *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae) to human and cow odours in the laboratory. *Bulletin of Entomological Research*, 91, 289–296.

Pathak, M.D. (1975) Utilization of insect-plant interaction in pest control. In *Insects, Science and Society* (Edited by Pimentel D.) Academic Press, London.

Patsoula, E., Beleri, B., Tegos, N., Mkrtisian, R., Vakali, A., & Pervanidou, D. (2020) Entomological Data and Detection of West Nile Virus in Mosquitoes in Greece (2014-2016), Before Disease Re-Emergence in 2017. *Vector Borne*

Zoonotic Diseases, 20, 60-70.

Patsoula, E., Beleri, S., Vakali, A., Pervanidou, D., Tegos, N., Nearchou, A., Daskalakis, D., Mourelatos, S., & Hadjichristodoulou, C. (2017) Records of *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera; Culicidae) and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera; Culicidae) expansion in areas in mainland Greece and Islands Vector Borne Zoonotic Diseases, 17, 217-223.

Parker, A.G., Vreysen, M.J.B., Bouyer, J., & Calkins, C.O. (2020) Sterile insect quality control/assurance. In Sterile Insect Technique; CRC Press: Boca Raton, Florida, USA, 399–440.

Paul, A., Harrington, L.C., Zhang, L., & Scott, J.G. (2005) Insecticide resistance in *Culex pipiens* from New York. Journal of American Mosquito Control Association 21, 305–309.

Paupy, C., Delatte, H., Bagny, L., Corbel, V., & Fontenille, D. (2009) *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. Microbes and Infection, 11, 1177-85.

Pereira-dos-Santos, T. (2020) A systematic review: is *Aedes albopictus* an efficient bridge vector for zoonotic arboviruses? Pathogens 9, 266.

Pereira-dos-Santos, T., Roiz, D., Lourenço-de-Oliveira, R., & Paupy, C. (2020) A Systematic Review: Is *Aedes albopictus* an Efficient Bridge Vector for Zoonotic Arboviruses? Pathogens, 9, 266.

Pereira dos Santos, T., Roiz, D., Santos de Abreu, F.V., Luz, S.L.B., Santalucia, M., Jiolle, D., Santos Neves, M.S.A., Simard, F., Lourenço-de-Oliveira, R., & Paupy, C. (2018) Potential of *Aedes albopictus* as a bridge vector for enzootic pathogens at the urban-forest interface in Brazil. Emerging Microbes & Infections, 7, 1–8.

Peters T.M., & Barbosa P. (1977) Influence of population density on size, fecundity, and developmental rate of insects in culture. Bibliography. Ref. Review."Annual-Review-of-Entomology (USA) 22, 431-450.

Petric, D., Bellini, R., Scholte, E.-J., Rakotoarivony, L.M., & Schaffner, F. (2014) Monitoring population and environmental parameters of invasive

mosquito species in Europe. *Parasites & Vectors*, 7, 187.

Peus, F. (1954) Ueber stechmuecke in Griechenland (Diptera, Culicidae). *Bonn. Zool. Beitr.* 1, 73-86

Pierre, V., Thiria, J., Rachou, E., Sissoko, D., Lassalle, C., & Renault, P. (2005) Epidémie de dengue 1 à la Réunion en 2004. *Journées de veille sanitaire*, Paris, 64.

Piovezan-Borges, A.C., Valente-Neto, F., Urbieto, G.L., Laurence, S.G.W., & de Oliveira Roque, F. (2022) Global trends in research on the effects of climate change on *Aedes aegypti*: International collaboration has increased, but some critical countries lag behind. *Parasites & Vectors*, 15, 346.

Poiani, A. (2006) Complexity of seminal fluid: A review. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 60, 289–310

Ponlawat, A., & Harrington, L.C. (2007) Age and body size influence male sperm capacity of the Dengue Vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 422–426.

Preechaporn, W., Jaroensutasinee, M., & Jaroensutasinee, K. (2006) The larval ecology of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in three topographical areas of South- ern Thailand. *Dengue Bulletin*, 30, 204–13.

Q

Qualls, W.A., Müller, G.C., Revay, E.E., Allan, S.A., Arheart, K.L., Beier, J.C., Smith, M.L., Scott, J.M., Kravchenko, V.D., Hausmann, A., Yefremova, Z.A., & Xue, R.-D. (2014) Evaluation of attractive toxic sugar bait (ATSB)—Barrier for control of vector and nuisance mosquitoes and its effect on non-target organisms in sub-tropical environments in Florida. *Acta Tropica*, 131, 104–110.

R

Ramalingam, S., & Craig, G.B. Jr. (1976) Functions of the male accessory gland secretions of *Aedes* mosquitoes (Diptera: Culicidae): Transplantation studies. *The Canadian Entomology*, 108, 955–960.

[300]

Ramalingam, S., & Craig, G.B. (1978) Fine structure of the male accessory glands in *Aedes triseriatus*. *Journal of Insect Physiology*, 24, 251–259.

Ramchurn, S.K., Moheeput, K., & Goorah, S.S. (2009) An analysis of a short-lived outbreak of dengue fever in Mauritius. *Eurosurveillance*, 14, 19314.

Reinert, J.F. (2009) List of abbreviations for currently valid generic-level taxa in family Culicidae (Diptera). *European Mosquito Bulletin*, 27, 68–76.

Reisen, W.K., Fang, Y., & Martinez, V.M. (2006) Vector Competence of *Culiseta Incidens* and *Culex thriambus* for West Nile Virus. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22, 662-665.

Reiskind, M.H., & Lounibos, L.P. (2009) Effects of intraspecific competition on adult longevity in the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Journal of Medical and Veterinary Entomology*, 23(1): 2–68.

Rendon, P., McInnis, D., Lance, D., Stewart, J. (2004) Medfly (diptera: Tephritidae) genetic sexing: large-scale field comparison of males-only and bisexual sterile fly releases in guatemala. *Journal of Economic Entomology* 97, 1547–1553.

Renshaw, M., Service, M.W., & Birley, M.H. (1994) Size variation and reproductive success in the mosquito. *Aedes cantans*. *Medical Veterinary Entomology*, 8, 179–186.

Restrepo, A.C., Baker, P., & Clements, A.C.A. (2014) National spatial and temporal patterns of notified dengue cases, Colombia 2007–2010. *Tropical Medicine & International Health*, 19, 863–871.

Revay, E.E., Müller, G.C., Qualls, W.A., Kline, D.L., Naranjo, D.P., Arheart, K.L., Kravchenko, V.D., Yefremova, Z., Hausmann, A., Beier, J.C., Schlein, Y., & Xue, R. (2014) Control of *Aedes albopictus* with attractive toxic sugar baits (ATSB) and potential impact on non-target organisms in St. Augustine, Florida. *Parasitology Research*, 113, 73–79.

Ribeiro, J.M. (1985) *Aedes aegypti*: model for blood finding strategy and prediction of parasite manipulation. *Experimental Parasitology*, 60, 118-132.

Ribeiro, J.M.C. (2000) Blood-feeding in mosquitoes: probing time and salivary

gland anti-haemostatic activities in representatives of three genera (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*). Medical and Veterinary Entomology, 14, 142-148.

Richards, S.L., Ponnusamy, L., Unnasch, T.R., Hassan, H.K., & Apperson, C.S. (2006) Host-feeding patterns of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in relation to availability of human and domestic animals in suburban landscapes of central North Carolina. Journal of Medical Entomology, 43, 543–551.

Richardson, A.J., & Williams, C.R. (2013) Inter-population mating success in Australian Dengue vector mosquitoes: Effects of laboratory colonization and implications for the spread of transgenics. Journal of Vector Ecology, 38, 111–119.

Rinehart, J.P., Robich, R.M., & 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, 43, 713-722.

Rivero, A., Magaud, A., Nicot, A., & Vézilier, J. (2011) Energetic Cost of Insecticide Resistance in *Culex pipiens* Mosquitoes. Journal of Medical Entomology, 48(3), 694–700.

Rizzoli, A., Bolzoni, L., Chadwick, E.A., Capelli, G., Montarsi, F., Grisenti, M., de la Puente, J.M., Muñoz, J., Figuerola, J., Soriguer, R., Anfora, G., Di Robich, R.M., & Denlinger, D.L. (2005) Diapause in the mosquito *Culex pipiens* evokes a metabolic switch from blood feeding to sugar gluttony. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102, 15912-15917.

Rizzoli, A., Jimenez-Clavero, M.A., Barzon, L., Cordioli, P., Figuerola, J., Koraka, P., Martina, B., Moreno, A., Nowotny, N., Pardigon, N., Sanders, N., Ulbert, S., Tenorio, A. (2015) The challenge of West Nile virus in Europe: knowledge gaps and research priorities, Euro Surveillance, 20, 21135.

Robinson, A.S., Cayol, J.P., & Hendrichs, J. (2002) Recent findings on medfly sexual behavior: Implications for SIT. Florida Entomologist, 85, 171–181.

Rochlin, I., Ninivaggi, D.V., Hutchinson, M.L., Farajollahi, A. (2013) Climate

[302]

Change and Range Expansion of the Asian Tiger Mosquito (*Aedes albopictus*) in Northeastern USA: Implications for Public Health Practitioners. PloS ONE, 8, e60874.

Rogers, D.J., Randolph, S.W., Snow. R.W., & Hay, S.I. (2002) Satellite imagery in the study and forecast of malaria. Nature, 415, 710–715.

Romi, R., Severini, F., & Toma, L. (2006) Cold acclimation and overwintering of female *Aedes albopictus* in Roma. Journal of the American Mosquito Control Association, 22, 149–151.

Roitberg, B., & Gordon, I., (2005) Does the *Anopheles* blood meal fecundity Curveg Curve? Journal of Vector Ecology, 30, 83–86.

Roitberg, B.D., Sircom, J., Roitberg, C.A., van Alphen, J.J.M., & Mangel M. (1993) Life expectancy and reproduction Nature, 364, 108.

Roiz, D., Figuerola, J., Muñoz, J., Soriguer, R., Roussel, M., & Ruiz, S. (2012) Efficacy of Mosquito Traps for Collecting Potential West Nile Mosquito Vectors in a Natural Mediterranean Wetland. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 86, 642–648.

Roiz, D., Rosa`, R., Arnoldi, D., & Rizzoli, A. (2010) Effects of Temperature and Rainfall on the Activity and Dynamics of Host-Seeking *Aedes albopictus* Females in Northern Italy. Vector-borne & Zoonotic Diseases, 10, 0.

Rosen, L. (1986) Dengue in Greece in 1927 and 1928 and the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever: new data and a different conclusion. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 35, 642-53.

Ross, P.A., Endersby-Harshman, N.M., & Hoffmann, A.A. (2019) A Comprehensive assessment of inbreeding and laboratory adaptation in *Aedes aegypti* mosquitoes. Evolutionary Applications, 12, 572–586.

Roth, A., Mercier, A., Lepers, C., Hoy, D., Duituturaga, S., Benyon, E., Guillaumot, L., & Souares, Y. (2014) Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya, and Zika virus infections – an unprecedented epidemic wave of mosquito borne viruses in the Pacific 2012–2014, Eurosurveillance 19, 20929.

Roy, D.N. (1931) On the breeding habits of *Anopheles stephensi* Liston as

[303]

observed in laboratory. Indian Journal of Medical Research, 29, 195-8.

Roy, S.G., Hansen, I.A., & Raikhel, A.S. (2007) Effect of insulin and 20-hydroxyecdysone in the fat body of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 37, 1317–26.

Roubaud, E. (1929) Cycle autogene d'attente et generations hivernales suractives inapparentes chez le moustique commun, *Culex pipiens* L. C, Research Academy of Science, Paris, 188, 735–738.

Roubaud, E. (1929) Autogenous cycle of winter generations of *Culex pipiens*. L. C. R. Acad. Sci. 188, 735–738.

Rowland, M. (1989) Changes in the circadian flight activity of the mosquito *Anopheles stephensi* associated with insemination, blood-feeding, oviposition and nocturnal light intensity. Physiological Entomology, 14(1): 77– 84.

Rudolf, I., Betášová, L., Blažejová, H., Venclíková, K., Straková, P., Šebesta, O., Mendel, J., Bakonyi, T., Schaffner, F., Nowotny, N., & Hubálek, Z. (2017) West Nile Virus in overwintering mosquitoes, central Europe. Parasites & Vectors, 10, 452.

Rudolf, M., Czajka, C., Börstler, J., Melaun, C., Jöst, H., von Thien, H., Badusche, M., Becker, N., Schmidt-Chanasit, J., Krüger, A., Tannich, E., & Becker, S. (2013) First nationwide surveillance of *Culex pipiens* complex and *Culex torrentium* mosquitoes demonstrated the presence of *Culex pipiens* biotype *pipiens/molestus* hybrids in Germany. PLoS One, 8, e71832.

Rueda, L.M. (2004) Pictorial keys for the identification of mosquitoes (diptera: Culicidae) associated with dengue virus transmission. Tech. rep., Walter Reed Army Institute Of Research, Washington Dc Department Of Entomology.

Rueda, L.M. (2008) Global diversity of mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) in freshwater. Hydrobiologia 595, 477 – 48.

Rueda, L.M., Iwakami, M., O'Guinn, M., Mogi, M., Prendergast, B.F., Miyagi, I., Toma, T., Pecor, J.E., & Wilkerson, R.C. (2005) Habitats and distribution of *Anopheles sinensis* and associated *Anopheles Hyrcanus* group in Japan. Journal of American Mosquito Control Association, 21, 458–463.

Rueda, L.M., Kim, H.C., Klein, T., Pecor, J., Li, C., Sithiprasasna, R., Debboun, M., & Wilkerson, R.C. (2006) Distribution and larval habitat characteristics of *Anopheles hyrcanus* Group and related mosquito species (Diptera: Culicidae) in South Korea. *Journal of Vector Ecology*, 31, 199–206.

Rueda, L.M., Patel, K.J., Axtell, R.C., & Stinner, R.E. (1990) Temperature-dependent development and survival rates of *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 27, 892–898.

Ruiling, Z., Tongkai, L., Dezhen, M., & Zhong, Z. (2018) Genetic characters of the globally spread tiger mosquito, *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae): implications from mitochondrial gene COI. *Journal of Vector Ecology*, 43, 89–97.

Rull, J., Arredondo, J., & Diaz-Fleischer, F. (2014) Improved mating performance of male *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) irradiated at low doses for release in Sterile Insect Technique programmes. *International Journal of Tropical Insect Science*, 34, 28–34.

Rull, J., Encarnacin, N., & Birke, A. (2012) Mass rearing history and irradiation affect mating performance of the male fruit fly, *Anastrepha Obliqua*. *Journal of Insect Science*, 12, 45.

Russel, G.E. (1978) *Plant Breeding for Pest and Disease Resistance*. Butterworths, Boston.

Ryan, R.O., & van der Horst, D.J., (2000) Lipid transport biochemistry and its role in energy production. *Annual Review of Entomology*, 45, 233-260.

S

Sakellariou, M., & Lane, J. (1977) Notes on the Culicidae recorded in the Copais district of Greece, 1974-1976. *Annales de l'Institut Phytopathologique Benaki* *Annales de l'Institut Phytopathologique Benaki*, 11, 302 – 309.

Samanidou-Voyadjoglou, A., & Darsie, Jr. R.F. (1993a) New country records for mosquito species in Greece. *Journal of American Mosquito Control*

Association, 9, 465–466.

Samanidou-Voyadjoglou, A., & Darsie, Jr. R.F. (1993b) An annotated checklist and bibliography of the mosquitoes of Greece (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematics*, 25, 177–185.

Samanidou, A. (1998) *Aedes cretinus*: Is it a threat to the Mediterranean Countries? *European Mosquito Bulletin, Journal of the European Mosquito Control Association*, 1, (8).

Samanidou-Voyadjoglou, A., & Harbach, R.E. (2001) Keys to the adult female mosquitoes (Culicidae) of Greece. *European Mosquito Bulletin*, 10, 13–20.

Samanidou, A., & Harbach, R. (2003) *Culex tritaeniorhynchus* Giles, a newly discovered potential of arboviruses in Greece. *European Mosquito Bulletin*, 16, 15-17.

Samanidou-Voyadjoglou, A., & Darsie, R.F., (1993) An annotated checklist and bibliography of the mosquitoes of Greece (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematics*, 25: 117-185.

Samanidou-Voyadjoglou, A., Patsoula, E., Spanakos, G., & Vakalis, N. (2005) Confirmation of *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in Greece. *European Mosquito Bulletin*, 19, 10-11.

Sanfelice, V. (2022) Mosquito-borne disease and newborn health. *Health Economics*, 31, 73–93.

Sang, S., Gu, S., Bi, P., Yang, W., Yang, Z., Xu, L., Yang J., Liu, X., Jiang, T., Wu, H., Chu, C., & Liu, Q. (2014) Predicting unprecedented dengue outbreak using imported cases and climatic factors in Guangzhou, 2014. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9, e0003808.

Santana, H., Trindade, F., Stabeli, R., Silva, A., Militao, J., & Facundo, V. (2015) Essential oils of leaves of *Piper* species display larvicidal activity against the dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*.

Saour, G., & Makee, H.M. (1997) Radiation induced sterility in male potato

[306]

tuber moth *Phthorimaea operculella* Zeller (Lep., Gelechiidae). Journal Applied Entomology, 121, 411-415.

Savage, H.M., Niebylski, M.L., Smith, G.C., Mitchell, C.J., & Craig, G.B. Jr (1993) Host-feeding patterns of *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) at a temperate North American site. Journal of Medical Entomology, 30, 27–34.

Savage, H.M., Ceianu, C., Nicolescu, G., Karabatsos, N., Lanciotti, R., Vladimirescu, A., Laiv, L., Ungureanu, A., Romanca, C., & Tsai, T.F. (1999) Entomologic and avian investigations of an epidemic of West Nile fever in Romania in 1996, with serologic and molecular characterization of a virus isolate from mosquitoes. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 61, 600-11.

Saxena, R.C., & Rueda, L.M. (1982) Morphological variation among three biotypes of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, in the Philippines. Insect Science and Its Application, 3, 193-210.

Sayer, E.J. (2006) Using experimental manipulation to assess the roles of leaf litter in the functioning of forest ecosystems. Biology Revue, 81, 1–31.

Scaraffia, P.Y., Zhang, Q., Thorson, K., Wysocki, V.H., & Miesfeld, R.L. (2010) Differential ammonia metabolism in *Aedes aegypti* fat body and midgut tissues. Journal of Insect Physiology, 56, 1040–9.

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

Schaffner, F., Angel, G., Geoffroy, B., Hervy, J.O., Rhaeim, A., & Brunhes, J. (2001) The mosquitoes of Europe / Les moustiques d'Europe. Identification and training programme. I.R.D. Éditions and EID Méditerranée. Montpellier.

Schaffner, F., Bellini, R., Petrić, D., Scholte, E.-J., Zeller, H., & Rakotoarivony, L.M. (2013) Development of guidelines for the surveillance of invasive mosquitoes in Europe. Parasites & Vectors, 6:209.

Schaffner, F., Mathis, A. (2014) Dengue and dengue vectors in the WHO European region: past, present, and scenarios for the future. Lancet Infectious Diseases, 14, 1271-80.

Scholte, E.J., Dijkstra, E., Blok, H., De Vries, A., Takken, W., Hofhuis, A., Koopmans, M., De Boer, A., & Reusken, C.B.E.M. (2008) Accidental importation of the mosquito *Aedes albopictus* into the Netherlands: a survey of mosquito distribution and the presence of dengue virus. *Medical and Veterinary Entomology*, 22, 352-8.

Scholte, E.J., & Schaffner, F. (2007) Waiting for the tiger: establishment and spread of the *Aedes albopictus* mosquito in Europe. In: Takken, W., Knols, B.G.J., editors. *Emerging pests and vector-borne diseases in Europe*. 1. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 241-60.

Scholte, E.-J., Takken, W., & Knols, B.G.J. (2007) Infection of adult *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Tropica*, 102(3): 151–158.

Scholte, E.J., Den Hartog, W., Dik, M., Schoelitsz, B., Brooks, M., Schaffner, F., Foussadier, R., Braks, & M., Beeuwkes, J. (2010) Introduction and control of three invasive mosquito species in the Netherlands. *Euro Surveillance*, 15, 11.

Scott, T.W., Naksathit, A., Day, J.F., Kittayapong, P., & Edman, J.D. (1997) Fitness advantage for *Aedes aegypti* and the viruses it transmits when females feed only on human blood. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 57, 235–239.

Sebesta, O., Rudolf, I., Betasova, L., Pesko, J., & Hubalek, Z. (2012) An invasive mosquito species *Aedes albopictus* found in the Czech Republic, 2012. *Euro Surveillance*, 17, 20301.

Seck, M.T., Pagabeleguem, S., Bassene, M.D., Fall, A.G., Diouf, T.A.R., Sall, B., Vreysen, M.J.B., Rayaissé, J.B., Takac, P., Sidibé, I., Parker, A.G., Mutika, G.N., Bouyer, J., & Gimonneau, G. (2015) Quality of sterile male tsetse after long distance transport as chilled, irradiated pupae. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 9, e0004229.

Seifert, R. P., & Barrera, R. (1981) Cohort studies on mosquito (Diptera: Culicidae) larvae living in the water-filled floral bracts of *Heliconia aurea* (Zingiberales: Musaceae). *Ecological Entomology*, 6, 191–197.

Shaikovich, E.V., Vinogradova, E.B., Bouattour, A. & de Almeida, A.P.G. (2016) Genetic diversity of *Culex pipiens* mosquitoes in distinct populations from Europe: contribution of *Cx. quinquefasciatus* in Mediterranean populations, *Parasites & Vectors*, 9, 47.

Shaman, J. (2002) Using a Dynamic Hydrology Model To Predict Mosquito Abundances in Flood and Swamp Water. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 8–13.

Shehata, A.Z. (2018) Feeding rate and reproductive performance of three mosquito species as influenced by different blood meal sources Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, C, Physiology Molecular Biology, 11, 77–84.

Shelton, R.M. (1973) The effect of temperatures on development of eight mosquito species. *Mosquito News*, 33, 1–12.

Shute, P.G. (1951) *Culex molestus*. *Transactions of the Entomological Society of London*. 102(7): 380–382.

Sim, C., & Denlinger, D. L. (2013) Insulin signaling and the regulation of insect diapause. *Frontiers in physiology*, 4, 189.

Simpson, G.G. (1961) *Principles of Animal Taxonomy*. New York: Columbia University Press.

Sinclair, B.J. (1999) Insect cold tolerance: how many kinds of frozen? *European Journal of Entomology*, 96, 157–164.

Sinka, M.E., Bangs, M.J., Manguin, S., Rubio-Palis, Y., Chareonviriyaphap, T., Coetzee, M., Mbogo, C.M., Hemingway, J., Patil, A.P., Temperley, W.H., Gething, P.W., Kabaria, C.W., Burkot, T.R., Harbach, R.E., & Hay, S.I. (2012) A global map of dominant malaria vectors. *Parasites & Vectors*, 5, 69.

Sinkins, S.P. (2004) *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34, 723–729.

Sinkins, S.P., Braig, H.R., & O'Neill, S.L. (1995) *Wolbachia pipientis*: Bacterial Density and Unidirectional Cytoplasmic Incompatibility between Infected Populations of *Aedes albopictus*. *Experimental Parasitology*, 81, 284–291.

Sivan, A., Shriram, A.N., Sunish1, I.P., & Vidhya, P.T. (2015) Host-feeding pattern of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in heterogeneous landscapes of South Andaman, Andaman and Nicobar Islands, India. *Parasitology Research*, 114, 3539–3546.

Smith, J.L., & Fonseca, D.M. (2004) Rapid assays for identification of members of the *Culex* (*Culex*) *pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: Culicidae). *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, 70, 339-45.

Smithburn, K.C., Hughes, T.P., Burke, A.V., & Paul, J.H (1940) A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, 20, 471-492.

Snetselaar, J., Andriessen, R., Suer, R.A., Osinga, A.J., Knols, B.G., Farenhorst, M. (2014) Development and evaluation of a novel contamination device that targets multiple lifestages of *Aedes aegypti*. *Parasites et Vectors*, 7, 200.

Sota, T., & Mogi, M. (1992) Survival time and resistance to desiccation of diapause and non-diapause eggs of temperate *Aedes* (*Stegomyia*) mosquitoes. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 63, 155–161.

Sousa, C.A., Clairouin, M., Seixas, G., Viveiros, B., Novo, M.T., Silva, A.C., Escoval, M.T., & Economopoulou, A. (2012) Ongoing outbreak of dengue type 1 in the Autonomous Region of Madeira, Portugal: preliminary report. *Eurosurveillance*, 17, 20333.

Sousa, C.A., Pinto, J., Almeida, A.P.G., Ferreira, C., do Rosario, V.E., & Charlwood, J.D. (2001) Dogs as a favoured host choice of *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae) of Sao Tom ~ e, West Africa. *Journal of Medical Entomology*, 38(1): 122-125.

Spanoudis, C.G., Andreadis, S.S., Tsaknis, N.K., Petrou, A.P., Gkeka, C.D., & Savopoulou – Soultani, M. (2019) Effect of temperature on biological parameters of the West Nile virus vector *Culex pipiens* form '*molestus*' (Diptera: Culicidae) in Greece: Constant vs fluctuating temperatures. *Journal of Medical Entomology*, 56, 641-50.

Spanoudis, C.G., Pappas, C.S., Savopoulou-Soultani, M., & Andreadis, S.S. (2021) Composition, seasonal abundance, and public health importance of mosquito species in the regional unit of Thessaloniki, Northern Greece. *Parasitology Research*, 120, 3083–3090.

Spielman, A., & Wong, J. (1973) Studies on autogeny in natural populations of *Culex pipiens*. 3. Midsummer preparation for hibernation in anautogenous populations. *Journal of Medical Entomology*, 10, 319-24.

Sproule, A., Broughton, S., and Monzu, N. (1992) Queensland fruit fly eradication campaign, W.A. Department of Agriculture, ed. (Perth, Australia).

Stanaway, J.D., Shepard, D.S., Undurraga, E.A., Halasa, Y.A., Coffeng, L.E., Brady, O.J., Hay, S.I., Bedi, N., Bensenor, I.M., Castañeda-Orjuela, C.A., Chuang, T-W., Gibney, K.B., Memish, Z.A., Rafay, A., Ukwaja, K.N., Yonemoto, N., & Murray, C.J.L. (2016) The Global Burden of Dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Infectious Diseases*, 16, 712–723.

Starks, K.J., Burton, R.L., & Merkle, O.G. (1983) Greenbugs (Homoptera: Aphididae) plant resistance in small grains and sorghum to biotype. *European Journal of Economic Entomology*, 76, 877-880.

Staten, R., Walters, M., Roberson, R., Birdsall, S., (1999) Area-wide management/maximum suppression of pink bollworm in southern California. In: Proceedings of the Beltwide Cotton Conference, National Cotton Council (Memphis, USA).
Steffan, W.A. (1975) Systematics and biological control potential of Toxorhynchites. *Mosquito Systematics*, 7, 59-6.

Stenn, T., Peck, K.J., Rocha Pereira, G., & Burkett-Cadena, N.D. (2019) Vertebrate hosts of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) as potential vectors of Zika virus in Florida. *Journal of Medical Entomology*, 56, 10–17.

Stojanovitch, P., & Scott, H.G., (1997) Illustrated Key to the Adult Male Mosquitoes of America (North of Mexico). Harold G. Scott, 121.00

Stouthamer, R., Breeuwer, J.A.J., & Hurst, G.D.D. (1999) *Wolbachia Pipientis*: Microbial Manipulator of Arthropod Reproduction. *Annual Review of*

Microbiology, 53, 71–102.

Styer, L.M., Meola, M.A., & Kramer, L.D. (2007) West Nile virus infection decreases fecundity of *Culex tarsalis* females. *Journal of Medical Entomology*, 44, 1074–1085.

Suman, D.S., Tikar, S.N., Mendki, M.J., Sukumaran, D., Agrawal, O.P., Parashar, B.D., & Prakash, S. (2011) Variations in life tables of geographically isolated strains of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Medical and Veterinary Entomology*, 25, 276–288.

Suman, D.S., Wang, Y., Bilgrami, A.L., & Gaugler, R. (2013) Ovicidal activity of three insect growth regulators against *Aedes* and *Culex* mosquitoes. *Acta Tropical*, 128, 103–109.

Sumanochitrapon, W., Strickman, D., Sithiprasasna, R., Kittayapong, P., & Innis, B.L. (1998) Effect of size and geographic origin of *Aedes aegypti* on oral infection with dengue-2 virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 58, 283–6.

T

Tan, A.W.A, Loke, S.R., Benjamin, S., Lee, H. L., Chooi, K.H., & Sofian-Arizun, M. (2012) Pray application of *Bacillus Thuringiensis Israelensis* (BTI strain AM65-52) against *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* Skuse populations and impact on dengue transmission in a dengue endemic residential site in Malaysia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, Bangkok, 43,2, 296-310.

Takken, W., & Knols, B.G.J. (1999) Odor-mediated behavior of afrotropical malaria mosquitoes. *Annual Review of Entomology*, 44, 131–157.

Takken, W., & Verhulst, N.O. (2013) Host Preferences of Blood-Feeding Mosquitoes. *Annual Review of Entomology*, 58, 433–453.

Takken, W., Curtis, C.F., Huisman, P.W., Akinpelu, O., & Gill, G.S. (2001a) Unexpected anthropophagic behaviour in *Anopheles quadriannulatus*. *Medical Veterinary Entomology*, 15, 293–298.

Takken, W., Klowden, M.J., & Chambers, G.M. (1998) Effect of body size on host seeking and blood meal utilization in *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae): the disadvantage of being small. *Journal of Medical Entomology*, 35, 639-45.

Taylor, P., Kaspi, R., Mossinson, S., & Yuval, B., (2001) Age-dependent insemination success of sterile Mediterranean fruit flies. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 98, 27–33.

Taylor, M., & Hoerauf, A. (1999) *Wolbachia* Bacteria of Filarial Nematodes. *Parasitology Today*, 15, 437–442.

Terblanche, J.S., & Chown, S.L. (2006) The relative contributions of developmental plasticity and adult acclimation to physiological variation in the tsetse fly, *Glossina pallidipes* (Diptera, Glossinidae). *Journal of Experimental Biology*, 209, 1064-1073.

Telang, A., Qayum, A., Parker, A., Sacchetta, B.R., & Byrnes, B.R (2011) Larval nutritional stress affects vector immune traits in adult yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (*Stegomyia aegypti*). *Medical and Veterinary Entomology*, 26, 271–281.

Tekle, A. (1960) The physiology of hibernation and its role in the geographical distribution of populations of the *Culex pipiens* complex. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 9, 321–330.

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.

Tipayamongkholgul, M., Fang, C.T., Klinchan, S., Liu, C.M., & King, C.C. (2009) Effects of the El Niño-southern oscillation on dengue epidemics in Thailand, 1996–2005. *BMC Public Health*, 9: 422.

Toledo, J., Rull, J., Ropeza, A., Hernández, E., & Liedo, P. (2004) Irradiation of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) Revisited: Optimizing sterility induction. *Journal of Economic Entomology*, 97, 383–389.

Traore, M.M., Junnila, A., Traore, S.F., Doumbia, S., Revay, E.E., Kravchenko, V.D., Schlein, Y., Arheart, K.L., Gergely, P., Xue, R.-D., Hausmann, A., Beck, R., Prozorov, A., Diarra, R.A., Kone, A.S., Majambere, S., Bradley, J., Vontas, J., Beier, J.C., & Müller, G.C. (2020) Large-scale field trial of attractive toxic sugar baits (ATSB) for the control of malaria vector mosquitoes in Mali, West Africa. *Malaria Journal*, 19, 72.

Tripet, F., Dolo, G., Traoré, S., & Lanzaro, G.C. (2004) The "Wingbeat Hypothesis" of Reproductive Isolation Between Members of the *Anopheles gambiae* Complex (Diptera: Culicidae) Does Not Fly. *Journal of Medical Entomology*, 41(3), 375–384,

Tseroni, M., Baka, A., Kapizioni, C., Snounou, G., Tsiodras, S., Charvalakou, M., Georgitsou, M., Panoutsakou, M., Psinaki, I., Tsoromokou, M., Karakitsos, G., Pervanidou, D., Vakali, A., Mouchtouri, V., Georgakopoulou, T., Mamuris, Z., Papadopoulos, N., Koliopoulos, G., Badieritakis, E., Diamantopoulos, V., Tsakris, A., Kremastinou, J., & Hadjichristodoulou, C. (2015) Prevention of Malaria Resurgence in Greece through the Association of Mass Drug Administration (MDA) to Immigrants from Malaria-Endemic Regions and Standard Control Measures. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9, e0004215.

Turelli, M., & Hoffmann, A.A. (1999) Microbe-induced cytoplasmic incompatibility as a mechanism for introducing transgenes into arthropod populations. *Insect Molecular Biology*, 8, 243–255.

Tuten, H.C., Bridges, W.C., Paul, K.S., & Adler, P.H. (2012) Blood-feeding ecology of mosquitoes in zoos. *Medical Veterinary Entomology* 26, 407–416.

Turell, M.J., Dohm, D.J., Sardelis, M.R., Oguinn, M.L., Andreadis, T.G., & Blow, J.A. (2005) An update on the potential of north American mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile virus. *Journal of Medical Entomology*, 42, 57-62.

U

Unlu, I., Farajollahi, A., Strickman, D., & Fonseca, D.M. (2013) Crouching tiger, hidden trouble: urban sources of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) refractory to source-reduction. PLoS ONE, 8, e77999.

V

Vakali, A., Beleri, S., Tegos, N., Fytrou, A., Mpimpa, A., Sergeantanis, T.N., Pervanidou, D., & Patsoula, E. (2023) Entomological Surveillance Activities in Regions in Greece: Data on Mosquito Species Abundance and West Nile Virus Detection in *Culex pipiens* Pools (2019–2020). Tropical Medicine Infectious Diseases, 8, 1.

Valerio, L., Marini, F., Bongiorno, G., Facchinelli, L., Pombi, M., Caputo, B., Maroli, M., & della Torre, A. (2010) Host-Feeding Patterns of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Urban and Rural Contexts within Rome Province, Italy. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 10, 291–294.

Valiakos, G., Papaspyropoulos, K., Giannakopoulos, A., Birtsas, P., Tsiodras, S., Hutchings, M.R., & Tsokana, C. (2014) Use of wild bird surveillance, human • 58 case data and GIS spatial analysis for predicting spatial distributions of West Nile virus in Greece. PLOS One, 9, e96935.

Van Handel, E., Edman, J.D., Day, J.F., Scott, T.W., Clark, G.G., Reiter, P., & Lynn, H.C. (1994) Plant-sugar, glycogen, and lipid assay of *Aedes aegypti* collected in urban Puerto Rico and rural Florida. Journal of American Mosquito Control Association, 10, 149-153.

Vargas, M. (1968) Sexual dimorphism of larvae and pupae of *Aedes aegypti* (Linn.), Mosquito News, 28, 374–379.

Velo, E., Kadriaj, P., Mersini, K., Shukullari, A., Manxhari, B., & Simaku, A. (2016) Enhancement of *Aedes albopictus* collections by ovitrap and sticky adult trap. Parasites & Vectors, 9, 223.

Villarreal, S.M., Pitcher, S., Helinski, M.E.H., Johnson, L., Wolfner, M.F., & Harrington, L.C. (2018) Male contributions during mating increase female survival in the disease vector mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*, 108, 1–9.

Vilibic-Cavlek, T., Savic, V., Petrovic, T., Toplak, I., Barbic, L., Petric, D., Tabain, I., Hrnjakovic-Cvjetkovic, I., Bogdanic, M., Klobucar, A., Mrzljak, A., Stevanovic, V., Dinjar-Kujundzic, P., Radmanic, L., Monaco, F., Listes, E., & Savini, G. (2019) Emerging trends in the epidemiology of West Nile and Usutu virus infections in southern Europe. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 437.

Vine, M.J. (1948) The anti-malaria campaign in Greece (1946). *Bull World Health Organ*, 1, 197e204.

Vinogradova, E.B., Shaikevich, E., & Ivanitsky, A.B. (2000) A study of the distribution of the *Culex pipiens* complex (Insecta: Diptera: Culicidae) mosquitoes in the European part of Russia by molecular methods of identification. *Comparative Cytogenetics*, 1(2), 129-138.

Vogels, C.B.F., Fros, J.J., Göertz, G.P., Pijlman, G.P., & Koenraadt, C.J.M. (2016) Vector competence of northern European *Culex pipiens* biotypes and hybrids for West Nile virus is differentially affected by temperature. *Parasites & Vectors*, 9, 393.

Vogels, C.B.F., Hartemink, N., & Koenraadt, C.J.M. (2017) Modelling West Nile Virus transmission risk in Europe: effect of temperature and mosquito biotypes on the basic reproduction number. *Scientific Reports*, 7, 5022.

Vreysen, M. J. B., Saleh, K. M., Ali, M. Y., Abdulla, A. M., Zhu, Z.-R., Juma, K. G., Dyck, V. A., Msangi, A. R., Mkonyi, P. A., Feldmann, H. U. (2000) *Glossina austeni* (Diptera: Glossinidae) Eradicated on the Island of Unguja, Zanzibar, Using the Sterile Insect Technique. *Journal of Economic Entomology*, 93, 123–135.

W

Walker, S. P., Wachs, T. D., Grantham-McGregor, S., Black, M. M., Nelson, C. A., Huffman, S. L., Baker-Henningham, H., Chang, S.M., Hamadani, J.D., Lozoff, B., Gardner, J.M.M., Powell, C.A., Rahman, A., & Richter, L. (2011) Inequality in early childhood: risk and protective factors for early child development. *The Lancet*, 378, 1325–1338.

Wallis, R.C., & Lang, C.A. (1956) Egg formation and oviposition in blood-fed *Aedes aegypti* L. *Mosquito News*, 16, 283–286.

Walsh, R.K., Facchinelli, L., Ramsey, J.M., Bond, J.G., & Gould, F., (2011) Assessing the impact of density dependence in field populations of *Aedes aegypti*. *Journal of Vector Ecology*, 36, 300–307.

Walter Reed Biosystematics Unit (WRBU) (2018) Walter Reed Biosystematics Unit. Mosquito Identification Resources. Smithsonian Institution, Washington, DC. http://www.wrbu.org/VecID_MQ.html. (Accessed September 12, 2018).

Walton, W.E. (2007) Larvivorous fish including *Gambusia*. In: "Biorational Control of Mosquitoes." (T. Floore, ed.). American Mosquito Control Association, Mount Laurel, NJ. *Journal of the American Mosquito Control Association* 23, 184-220.

Walton, C., Sharpe, R.G., Pritchard, S.J., Thelwell, N.J., & Butlin, R.K., (1999) Molecular identification of mosquito species. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68, 241–256.

Waterston, J. (1918a) On the mosquitoes of Macedonia. *Bulletin Entomology Research*, 9, 1-12.

Wesenberg-Lund, C. (1920) Contributions to the Biology of the Danish Culicidae (A.F. Høst & Søn).

Whitten, M., Mahon, R. (2005) Misconceptions and constraints. In: Dyck, VA, Hendrichs, J, Robinson, AS, eds. *Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. Dordrecht, The

Netherlands: Springer, 601–626.

White, S., Rohani, M.P., & Sait, S.M. (2010) Modelling pulsed releases for sterile insect techniques: fitness costs of sterile and transgenic males and the effects on mosquito dynamics. *Journal of Applied Ecology*, 47, 1329–1339.

Whyard, S., Erdelyan, C.N.G., Partridge, A.L., Singh, A.D., Beebe, N.W., & Capina, R. (2015) Silencing the buzz: a new approach to population suppression of mosquitoes by feeding larvae double-stranded RNAs. *Parasites & Vectors*, 8, 96.

Wilke, A.B.B., Christe, R.dO., Multini, L.C., Vidal, P.O., Wilk-da-Silva, R., de Carvalho, G.C., & Marelli, M.T. (2016) Morphometric Wing Characters as a Tool for Mosquito Identification. *PLoS ONE*, 11, e0161643.

Wilkerson, R.C., Linton, Y.-M., Fonseca, D.M., Schultz, T. R., Price, D.C., & Strickman, D.A. (2015) Making Mosquito Taxonomy Useful: A Stable Classification of Tribe *Aedini* that Balances Utility with Current Knowledge of Evolutionary Relationships. *PLOS ONE*, 10, e0133602.

Wilson, A.L., Courtenay, O., Kelly-Hope, L.A., Scott, T.W., Takken, W., Torr, S.J., & Lindsay, S.W. (2020) The importance of vector control for the control and elimination of vector-borne diseases. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 14, e0007831.

Wiljeyaratne, Mahendra, P. (1975) Effects of sub-lethal larvicide on population and flight characteristics of *Culex pipiens quinquefasciatus* (DIPTERA: CULICIDAE), The University of Texas School of Public Health ProQuest Dissertations Publishing, 24.

Winstead, R. W., Illavoso, E.J.V., & Mc Govern, W.L. (1990) Irradiated boll weevils (Coleoptera: Curculionidae): Isolated field studies of competitiveness. *Journal of Economic Entomology*, 83, 1853-1857.

Womack, M.L. (1993) Distribution, abundance and bionomics of *Aedes albopictus* in southern Texas. *Journal of American Mosquito Control Association*, 9, 367-9.

Wong, P.S., Li, M.Z., Chong, C.S., Ng, L.C., & Tan, C.H. (2013) *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse): a potential vector of Zika virus in Singapore.

[318]

PLoS Neglected Tropical Diseases, 7, e2348.

Woodring, J., & Davidson, E.W. (1996) Biological control of mosquitoes, in: The biology of disease vectors. (B. J. Beaty, and W. C. Marquardt, eds.), University Press of Colorado, USA, 530-548.

Wooding, M., Naudé, Y., Rohwer, E., & Bouwer, M. (2020) Controlling mosquitoes with semiochemicals: a review. Parasites Vectors, 13, 80.

Woodring, J.L., Higgs, S., & Beaty, B.J. (1996) Natural cycles of vector-borne pathogens. In: Beaty, B.J. & Marquardt, W.C. (eds). The biology of disease vectors. University Press of Colorado, Niwot, CO, USA, 51-72.

World Health Organization (2020) Guidance Framework for Testing the Sterile Insect Technique as a Vector Control Tool against Aedes-Borne Diseases, WHO: Geneva, Switzerland.

World Health Organization (2014) World Malaria Report. Who Global Malaria Programme, Geneva, Switzerland, 1-242 Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>

World Health Organization (WHO) (2018) Dengue and Severe Dengue Fact Sheet. Geneva, Switzerland, Available online: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>

World Health Organization (WHO) (2015) World Malaria Report 2015. Nature, Geneva, Switzerland, 1-280 Available: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/200018/9789241565158_eng.pdf;jsessionid=03F6CE2BB240E3067A71BB214C9D2D94?sequence=1

World Health Organization (WHO) (2012) Handbook for Integrated Vector Management. Geneva, Switzerland, 67.

World Health Organization (WHO) (2012) Global Plan for Insecticide Resistance Management in Malaria Vectors.

World Health Organization (WHO) (2013) Global Plan for Insecticide Resistance Management in Malaria Vectors.

World Health Organization (WHO) (2010) Global programme to eliminate lymphatic filariasis (GPELF): Progress Report 2000–2009 and Strategic Plan 2010–2020, Geneva, Switzerland, 1-94.

World Health Organization and UNICEF (WHO & UNICEF) (2017) Global Vector Control Response 2017–2030, Geneva, Switzerland, 1-64.

World Health Organization (WHO) (2022) Zika virus, Fact sheets, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>

World Health Organization (WHO) (2013) World Malaria Report 2013. Meeting report, Geneva, Switzerland, 1-286, <https://www.who.int/publications/i/item/9789241564694>

World Health Organization (WHO) (2016) World Malaria Report 2016. Meeting report, Geneva, Switzerland, 1-186, <https://www.who.int/publications/i/item/9789241511711>

Wu, T.P., Hu, Q., Zhao, T.Y., Tian, J.H., & Xue, R.D. (2014) Morphological studies on *Culex molestus* of the *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) in underground parking lots in Wuhan, central China. Florida Entomology, 97(3): 1191–1198.

Wyss, J. H. (2006) Screwworm Eradication in the Americas. Annals of the New York Academy of Sciences, 1, 186–193.

X

Xi, Z. (2005) *Wolbachia* Establishment and Invasion in an *Aedes aegypti* Laboratory Population. Science, 310, 326–328.

Xue, R.D., Barnard, D.R., & Ali, A. (2009) Influence of multiple blood meals on gonotrophic dissociation and fecundity in *Aedes albopictus*. Journal of American Mosquito Control, 25, 504–507.

Xue, R-D., Barnard, D.R., & Muller, G.C. (2010) Effects of Body Size and Nutritional Regimen on Survival in Adult *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). Journal of Medicine Entomology, 47, 778-782.

Xue, R.D., Barnard, D.R., & Schreck, C.E (1995) Effect of body size, parity, and age of *Aedes albopictus* on human host attack rates and the repellency of deet. *Journal of American Mosquito Control Association*, 11, 50-53.

Y

Yadav, R., Tyagi, V., Sharma, A.K., Tikar, S.N., Sukumaran, D., & Veer, V. (2017) Overcrowding Effects on Larval Development of Four Mosquito species *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles stephensi*. *International Journal of Research Studies in Zoology*, 3, 1-10.

Yang, D., He, Y., Ni, W., Lai, Q., Yang, Y., Xie, J., Zhu, T., Zhou, G., & Zheng, X. (2020) Semi-feld life-table studies of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Guangzhou, China. *PLoS ONE*, 15, e0229829

Yeap, H.L., Endersby, N.M., Johnson, P.H., Ritchie, S.A., & Hoffmann, A.A. (2013) Body size and wing shape measurements as quality indicators of *Aedes aegypti* mosquitoes destined for field release. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, 89, 78–92.

Yunicheva, Y.U., Ryabova, T.E., Markovich, N.Y., Bezzhonova, O.V., Ganushkina, L.A., Semenov, V.B., Tarkhov, G.A., Vasilenko, L.E., Guzeeva, T.M., Shevereva, T.V., & Sergiev, V.P. (2008) First data on the presence of breeding populations of the *Aedes aegypti* L. mosquito in Greater Sochi and various cities of Abkhazia. *Meditinskaia Parazitologiya I Parazitarnye Bolezni*, 3, 40–43.

Yuval, B., Wekesa, J., & Washino, R. (1993) Effects of body size on swarming behaviour and mating success of male *Anopheles freeborni* (Diptera: Culicidae). *Journal of Insect Behavior*, 6, 332–342.

Z

Zabalou, S., Riegler, M., Theodorakopoulou, M., Stauffer, C., Savakis, C., & Bourtzis, K. (2004) Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility as a

means for insect pest population control. Proceedings of the National Academy of Sciences, 101, 15042–15045.

Zhao, J., Tang, T., & Wang, X. (2020) Effects of landscape composition on mosquito population in urban green spaces. Urban Forestry & Urban Greening, 49, 126626.

Zheng, X., Zhang, D., Li, Y., Yang, C., Wu, Y., Liang, X., Liang, Y., Pan, X., Hu, L., Sun, Q., Wang, X., Wei, Y., Zhu, J., Qian, W., Yan, Z., Parker, A.G., Gilles, J.R.L., Bourtzis, K., Bouyer, J., Tang, M., Zheng, B., Yu, J., Liu, J., Zhuang, J., Hu, Z., Zhang, M., Gong, J-T, Hong, X-Y., Zhang, Z., Lin, L., Liu, Q., Hu, Z., Wu, Z., Baton, L.A., Hoffmann, A.A., & Xi, Z. (2019) Incompatible and Sterile Insect Techniques combined eliminate mosquitoes. Nature, 572, 56–61.

Zimmer, C. (2001) Wolbachia: A Tale of Sex and Survival. Science, 292, 1093–1095.

Zittra, C., Flechl, E., Kothmayer, M., Vitecek, S., Rossiter, H., Zechmeister, T., & Fuehrer, H. (2016) Ecological characterization and molecular differentiation of *Culex pipiens* complex taxa and *Culex torrentium* in eastern Austria. Parasites & Vectors, 9, 197.

Zug, R., & Hammerstein, P. (2012) Still a Host of Hosts for Wolbachia: Analysis of Recent Data Suggests That 40% of Terrestrial Arthropod Species Are Infected. PLoS ONE, 7, e38544.

Zuk, M. (1988) Parasite load, body size, and age of wild-caught male field crickets (Orthoptera: Gryllidae): effects on sexual selection. Evolution : An International Journal of Organic Evolution, 42, 969–976.

Zumpreoglu, A., Ohinata, K., Ujimoto, M.F., Higa, H. & Harris, E.J. (1979) Gamma irradiation of the Mediterranean fruit fly: effect of treatment of immature pupae in nitrogen on emergence, longevity, sterility, sexual competitiveness, mating ability, and pheromone production of males. Journal of Economic Entomology, 72, 173-176.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βογιατζόγλου - Σαμανίδου, Α. (2011) Τα κουνούπια της Ελλάδας: Μορφολογία, βιολογία, δημόσια υγεία, κλείδες προσδιορισμού, αντιμετώπιση. ΑγροΤύπος ΑΕ, 112 σελ. ISBN 978-960-7667-43-4

Γεροφώτης, Δ.Χ., Ιωάννου, Χ.Σ., Μαμούρης, Ζ.Δ., Χατζηχριστοδούλου, Χ.Σ. & Παπαδόπουλος, Ν.Σ. (2013) Συλλήψεις ενηλίκων κουνουπιών σε παγίδες στην ευρύτερη περιοχή της λίμνης Κάρλας και στοιχεία για τη γενετική δομή των πληθυσμών τους. 15^ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο, 22-25 Οκτωβρίου 2011, Καβάλα. Πρακτικά Συνεδρίου, 195.

Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας (ΕΟΔΥΥ) (2011-2012) Επιδημιολογικά και εντομολογικά δεδομένα Περιφέρειας Θεσσαλίας. Έκθεση επιδημιολογικής επιτήρησης, Ελονοσία στην Ελλάδα, 1-11, https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/01/3ekthesi_thessalias_2011_2012_site.pdf

Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας (ΕΟΔΥΥ) (2014) Επιδημιολογικά και εντομολογικά δεδομένα Περιφέρειας Θεσσαλίας. Έκθεση επιδημιολογικής επιτήρησης, Ελονοσία στην Ελλάδα, 1-11 https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/01/ekthesi_entomologikis_epitirisis_2014.pdf

Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας (ΕΟΔΥΥ) (2020) Ετήσια έκθεση επιδημιολογικής επιτήρησης της λοίμωξης από ιό του Δυτικού Νείλου σε ανθρώπους, Ελλάδα, 1-9, https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2022/04/entomologiki_2019_2020_v2.pdf

Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας (ΕΟΔΥΥ) (2021) Έκθεση εντομολογικής επιτήρησης, Ελλάδα, 1-34, https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2022/04/entomologiki_2021.pdf

Καρδαμάτης, Ι. (1907) Τινά περί των εν Ελλάδι κωνώπων. Η Ελονοσία εν Ελλάδι και τα Πεπραγμένα του Συλλόγου προς Περιστολήντων Ελωδών Νόσων. Έτος Α και Β., 169

Καρδαμάτης, Π.Ι. (1908) Πραγματεία περί ελειογενών νόσων. Εκ του υπογραφείου Παρασκευά Λεωνή, Αθήνα, 765.

Λιβαδάς, Γ.Α. & Σφάγγος, Κ. Ι. (1940b) Η Ελονοσία εν Ελλάδι (1930-1940). Έρευνα-καταπολέμησις. Μέρος Β'. Τύποις «Πυρσού» Α.Ε., Αθήναι, 302.

Λιβαδάς, Γ.Α., Κορογιαννάκης, Φ.Κ. & Ίσαρης, Π.Κ. (1949) Η καταπολέμησις της ελονοσίας εν Ελλάδι κατά την τετραετίαν 1946-1949. Ακαδημαϊκή Ιατρική. Έτος 13^{ον}, 8: 43.

Μαστρονικολός, Γ. (2014) Σύγκριση ελκυστικότητας διαφορετικών τύπων παγίδων ενηλίκων για κουνούπια σε μια αστική περιοχή της Θεσσαλίας. Μεταπτυχιακή Διατριβή ειδίκευσης «Φυτιατρική και Περιβάλλον».

Μανουσάκης, Ε. (1939) Το ελονοσιακόν πρόβλημα. Έρευναι και εφαρμογαί εν Θεσσαλία. Ο ολοκληρωτικός αγών κατά της ελονοσίας. Λάρισα, Εκδοτικός Οίκος Γ.Β. Δημητρακόπουλου, 428.

Μουτούσης, Κ., (1933) Ανωφελισμός και ελονοσία εν Ελλάδι. Η εν Αθήναις Ιατρική Εταιρία. Συνεδρία 3^{ης} Δεκεμβρίου 1932. Εν Αθήναις 1933. Πρακτικά των συνεδρίων του έτους 1932, 600-613.

Μπέτζιος, Β.Χ (1989) Αρθρόποδα υγειονομικής σημασίας. Μορφολογία, βιολογία, οικολογία, υγειονομική σημασία, καταπολέμηση. Αθήνα, 260

Σάββας, Κ.Γ. & Καρδαμάτης, Ι.Π. (1912) Η ελονοσία εν Ελλάδι και τα πεπραγμένα του Συλλόγου. Σύλογος προς περιστολήν των ελοδών νόσων. 1914-1928. Εν Αθήναις 1928, 830.

Σάββας, Κ.Γ. & Καρδαμάτης, Ι.Π. (1907) Η ελονοσία εν Ελλάδι και τα πεπραγμένα του Συλλόγου. Σύλογος προς περιστολήν των ελοδών νόσων. Έτος πρώτον και δεύτερον. Εν Αθήναις 1907, 653.

Σαββοπούλου Σουλτάνη, Μ., Ανδρεάδης, Σ.& Σουλτάνη, Χ. (2011) Έντομα και άλλα αρθρόποδα υγειονομικής σημασίας . Βιολογία – Οικολογία – Αντιμετώπιση. Publish City.

Πεππέ, Π. (2015) Μοριακή ταυτοποίηση ειδών κουνουπιών για ανίχνευση φορέων του ιού του Δυτικού Νείλου., Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Σχολή Επιστημών Υγείας. Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. Διπλωματική πτυχιακή εργασία, Acta Tropica, 208, 105514

Ιστοσελίδες

https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%92%CE%B9%CE%BF%CE%BB%CE%BF%CE%B3%CE%B9%CE%BA%CF%8C%CF%82_%CE%BA%CF%8D%CE%BA%CE%BB%CE%BF%CF%82_%CF%84%CE%B7%CF%82_%CE%B6%CF%89%CE%AE%CF%

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ
του
Γεώργιου Δ. Μαστρονικολού

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Τόπος καταγωγής : Καρίτσα Αγιάς, Λάρισα
Τόπος διαμονής : Λάρισα
Ταχυδρομική διεύθυνση : Ραφήνας 10, 41334, Λάρισα
Ημερομηνία γέννησης : 27 Φεβρουαρίου 1990
Στρατιωτικές Υποχρεώσεις : Εκπληρωμένες

Στοιχεία Επικοινωνίας

Τηλέφωνο : +30 6978452772
Email : mastronikgeo@ymail.com
Skype : George Mastronikolos

ΣΠΟΥΔΕΣ

2013: Πτυχίο Γεωπονικής Σχολής κατεύθυνσης Αγροτικής Οικονομίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. **Βαθμός: 7,79**

2013: Χορήγηση πιστοποιητικού της Σχολής Γεωπονίας, Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος του τμήματος Γεωπονίας που δικαιολογεί την ακαδημαϊκή ισοδυναμία του πτυχίου υπό την διεθνή ονομασία **MASTER**.

2015: Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος με τίτλο «Αειφόρος Αγροτική Παραγωγή και Διαχείριση Περιβάλλοντος» ειδίκευσης «Φυτιατρική και Περιβάλλον», Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. **Βαθμός: 8,80**

2016 - τώρα: Υποψήφιος Διδάκτωρ Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας στη σχολή Γεωτεχνικών Επιστημών, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος (Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας).

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ - ΒΡΑΒΕΙΑ

2011: Πρόγραμμα ανταποδοτικών υποτροφιών - Εργαστήριο Εφαρμοσμένης Ζωολογίας και Παρασιτολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

2011: Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) με βραβείο για την διάκριση στις σπουδές και στο ήθος.

2012: Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).

2013: Κληροδότημα χρηματικού βραβείου Δωρεάς στη μνήμη καθηγητή Χρήστου Μ. Ζιωγάνα.

2013: Υποτροφία στο πλαίσιο της πράξης με Τίτλο: «Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών του ΙΚΥ για Μεταπτυχιακές Σπουδές-Οριζόντια Πράξη» του επιχειρησιακού προγράμματος

«Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» για Μεταπτυχιακές Σπουδές Α Κύκλου στην Ελλάδα.

2014: Angelopoulos CGIU Fellow 2014.

2017: Υποτροφία με τίτλο «LIFE BIODELEAR: Addressing Med fly with an innovative and environment friendly attractant through an Integrated Pest_ΕΘΝΙΚΗ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ» - Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

2017: Clinton Global Initiative University Fellow (CGIU) στο Northeastern University in Boston, Massachusetts.

2018: Υποτροφία με τίτλο «LIFE BIODELEAR: Addressing Med fly with an innovative and environment friendly attractant through an Integrated Pest_ΕΘΝΙΚΗ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ» - Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

2018 - 2019: Board New Leaders Committee (Hellenic Initiative)

2018 - 2021: Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ): «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» - 2ος Κύκλος, στο πλαίσιο της Πράξης με κωδικό ΟΠΣ 5000432 του Ε.Π. «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του ΕΣΠΑ (2014-2020).

2019: Forbes list 30 under 30 Greece

ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

2016: «Region training course on fruit fly detection, surveillance and area-wide integrated pest management for Balkans and eastern Mediterranean»

organized by the International Atomic Energy Association (IAEA) in corporation with the Government of Croatia through the Croatian Center for Agriculture, Food and Rural Affairs.

2019: TN-INT5155-1805519 Interregional Training Course on Use of the Sterile Insect and Related Techniques for the Area-wide Integrated Management of Insect Pests, Tapachula Chiapas, Mexico/ Guatemala City, Guatemala 10 JUN - 5 JUL 2019

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

2014: Angelopoulos CGIU Fellowship

«Population dynamics and phenology of West Nile virus vectors in an urban area of Thessaly».

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ – ΓΝΩΣΗ Η/Υ

Αγγλικά

2003: Certificate of Competency in English as a second language (The University of Michigan).

2006: Certificate of Proficiency in English as a second or foreign language (The University of Michigan).

2009: Επάρκεια προσόντων διδασκαλίας της Αγγλικής Γλώσσας σε Κ.Ξ.Γ

Γαλλικά

2004: Diplome d' etudes en langue francaise (DELFI – 1er Degre). **2005:**

Diplome d' etudes en langue francaise (DELFI – 2nd Degre). **Γνώση Η/Υ**

2010: International Diploma in IT Skills Proficiency (University of Cambridge International Examinations).

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Sergaki, P., Mastronikolos, G., Kontogeorgos, A. and A. Semos (2015). "Linking strategic orientation with performance level: A case of greek agricultural cooperatives". Conference Papers 261307, Indian Society of Agricultural Economics.

Balatsos G., Puggioli A., Karras V., Lytra I., Mastronikolos G., Carrieri M., Papachristos P. D., Malfacini M., Stefopoulou A., Ioannou S. C., Balestrino F., Bouyer J., Petric D., Pajovic I., Kapranas A., Papadopoulos T.N., Milonas G. P., Bellini R., Michaelakis A. (2021). Reduction in Egg Fertility of *Aedes albopictus* Mosquitoes in Greece Following Releases of Imported Sterile Males. *Insects* 2021, 12(2), 110; <https://doi.org/10.3390/insects12020110>.

Mastronikolos G., Apostolos Kapranas, George K. Balatsos, Charalampos Ioannou, Dimitrios P. Papachristos, Panagiotis G. Milonas, Arianna Puggioli, Igor Pajović, Dušan Petrić, Romeo Bellini, Antonios Michaelakis, Nikos T. Papadopoulos*. Quality control methods for *Aedes albopictus* sterile male transportation, *Insects* 2022, 9, 13(2), 179.

ΣΥΝΕΔΡΙΑ

2014: Inter-conference Symposium of International Association of Agricultural Economics – IAAE στην Ινδία με παρουσίαση της πτυχιακής εργασίας:

«Different strategic orientations results in different performance levels: The case of Greek agricultural cooperatives».

2015: 16^ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο με poster:

«Σύγκριση ελκυστικότητας διαφορετικών τύπων παγίδων ενηλίκων κουνουπιών σε μια αστική περιοχή της Θεσσαλίας».

2016: «Region training course on fruit fly detection, surveillance and area-wide integrated pest management for Balkans and eastern Mediterranean» organized by the International Atomic Energy Association (IAEA) in corporation with the Government of Croatia through the Croatian Center for Agriculture, Food and Rural

Affairs.

2018: «Regional Coordination Meeting on Progresses and Perspectives on the Control Programmes for *Aedes* Invasive Mosquitoes Including Pilot SIT Trials, 17-19 December 2018, Vienna, Austria».

2019: 17⁰ Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο: «**Ποιοτικός έλεγχος στειρωμένων κουνουπιών του *Aedes albopictus***».

2022: 18⁰ Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο με poster: «**Επιδράσεις της διαθεσιμότητας τροφής και του συνωστισμού στους παράγοντες αρμοστικότητας των ανήλικων σταδίων και στα ενήλικα του *Aedes albopictus***».

2020: Regional coordination meeting on the potential use of the Sterile Insect Technique for the Integrated Control of *Aedes* invasive mosquito in Europe (ME-RER 0044-1906865)

2023: XII European Congress of Entomology (ECE): «**Effect of blood meals and mating on demographic traits of *Aedes albopictus* adults**».

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

2011: Πρακτική άσκηση στον Αγροτικό Οينوποιητικό Συνεταιρισμό Τιρνάβου στις αρχές της Ολοκληρωμένης Διαχείρισης αγροτικών προϊόντων (IPM).

2012: Απασχόληση στους κήπους του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, στο Αγρόκτημα του Πανεπιστημίου, από τον Ιούλιο έως και τον Αύγουστο.

Αποκτήθηκε εμπειρία σε θέματα που αφορούν την καλλιέργεια λαχανικών σύμφωνα με τις αρχές της βιολογικής γεωργίας με παροχή συμβουλών στους καλλιεργητές των κήπων.

Σεπτέμβρης 2014/2015/2016/2017: Ποιοτικός έλεγχος σταφυλιών στον Αγροτικό Οينوποιητικό Συνεταιρισμό Τιρνάβου.

26/9/2016 - 30/11/2016: Σημμετοχή σε εργαστηριακές αναλύσεις δειγμάτων παγίδων για την διαπίστωση εχθρών καραντίνας που προβλέπονται στην επιστημονική έρευνα με ΚΩΔΙΚΟ ΕΡΓΟΥ 3931.01 και τίτλο Πρόγραμμα επισκοπήσεων για τους επιβλαβείς οργανισμούς καραντίνας.

25/7/2017 - 30/11/2017: Σημμετοχή σε εργαστηριακές αναλύσεις δειγμάτων

παγίδων για την διαπίστωση εχθρών καραντίνας που προβλέπονται στην επιστημονική έρευνα με ΚΩΔΙΚΟ ΕΡΓΟΥ 3931.02 και τίτλο Πρόγραμμα επισκοπήσεων για τους επιβλαβείς οργανισμούς καραντίνας *Drosophila suzukii*, *Bactrocera* spp. και *Rhagoletis fausta*.

2020 – τώρα: Παραγωγός σταφυλιών, κασάνου και ελαιόλαδου.

Μάρτιος – Οκτώβριος 2022, Οκτώβριος 2023 – σήμερα: Γεωπόνος στον ΕΛΓΑ. Εκτιμητική σε δένδρωςδεις και εκτατικές καλλιέργειες.

ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΑ

2001: Tae Kwon Do - Πιστοποίηση 1 Poom Black (1stDan) σύμφωνα με τους κανόνες και θεσμοθετήσεις του Kukkiwon.

2006: Συμμετοχή στη 14η Εθνική Συνδιάσκεψη Επιλογής του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου Νέων Ελλάδας.

Article

Quality Control Methods for *Aedes albopictus* Sterile Male Transportation

Georgios D. Mastronikolos ¹, Apostolos Kapranas ^{2,3} , George K. Balatsos ², Charalampos Ioannou ¹, Dimitrios P. Papachristos ² , Panagiotis G. Milonas ² , Arianna Puggioli ⁴ , Igor Pajović ⁵ , Dušan Petrić ⁶, Romeo Bellini ⁴ , Antonios Michaelakis ²  and Nikos T. Papadopoulos ^{1,*} 

- ¹ Laboratory of Entomology Department of Agriculture, Crop Production and Rural Environment, University of Thessaly, 38446 Volos, Greece; mastronikgeo@gmail.com (G.D.M.); ioannoubabis@yahoo.com (C.I.)
- ² Scientific Directorate of Entomology and Agricultural Zoology, Benaki Phytopathological Institute, 14561 Kifissia, Greece; akapranas@agro.auth.gr (A.K.); g.balatsos@bpi.gr (G.K.B.); d.papachristos@bpi.gr (D.P.P.); p.milonas@bpi.gr (P.G.M.); a.michaelakis@bpi.gr (A.M.)
- ³ Laboratory of Applied Zoology and Parasitology, School of Agriculture, Aristotle University of Thessaloniki, 54124 Thessaloniki, Greece
- ⁴ Centro Agricoltura Ambiente “G. Nicoli”, 40014 Crevalcore, Italy; apuggioli@caa.it (A.P.); rbellini@caa.it (R.B.)
- ⁵ Biotechnical Faculty, University of Montenegro, 81000 Podgorica, Montenegro; pajovicb.igor@gmail.com
- ⁶ Faculty of Agriculture, University of Novi Sad, 21000 Novi Sad, Serbia; dusan.petric@polj.uns.ac.rs
- * Correspondence: nikopap@uth.gr

Simple Summary: The Sterile Insect Release Technique (SIT) is currently considered an environmentally friendly method to control populations of *Aedes albopictus*, an invasive mosquito species in Europe and elsewhere. Assessing the quality of mass reared, sterilized males that are transported to release sites is of the utmost importance for the success of the SIT programs. The current paper presents a series of quality control (QC) tests that have been conducted at the mass rearing facility in Italy and at delivery points in Greece and Montenegro to assess the impact of mass rearing, sterilization, and shipping on survival during transportation, longevity, flight ability and mating performance. Overall, our results reveal the detrimental effects of a long transportation period on the sterile male *Ae. albopictus* and provide a series of reliable QC tests to be considered in future SIT operations.

Abstract: Genetic based mosquito control methods have been gaining ground in recent years for their potential to achieve effective suppression or replacement of vector populations without hampering environments or causing any public health risk. These methods require the mass rearing of the target species in large facilities sized to produce millions of sterile males, as already well established for a number of insects of agricultural importance. Assessing the performance of released males in Sterile Insect Technique (SIT) control programs is of the utmost importance for the success of the operation. Besides the negative effects of mass rearing and sterilization, the handling of sterilized insects and shipment to distant areas may also negatively impact the quality of sterilized males. The aim of the current study was to design and executive quality control (QC) tests for sterilized *Aedes albopictus* (Asian tiger mosquito) males delivered by air shipment from the mass production facility located in Italy to Greece and Montenegro field release sites. Mass reared mosquito strains were based on biological materials received from Italy, Greece and Montenegro. Tests conducted at the mass rearing facility before transportation revealed a rather high residual female contamination following mechanical sex separation (approximately 1.5% females, regardless of the mosquito strain). Irradiated males of all three mosquito strains induced high levels of sterility to females. Shipment lasting approximately 24 h resulted in approximately 15% mortality, while when shipment lasted nearly two days this increased to almost 40%. The flight ability of sterilized males following one day transportation time was satisfactory (over 60%). The response of sterile males to food and water starvation was comparable and slightly lower than that of wild non-transported males. Longevity of sterile males was shorter than that of wild counterparts and it seems it was not affected by mating to



Citation: Mastronikolos, G.D.; Kapranas, A.; Balatsos, G.K.; Ioannou, C.; Papachristos, D.P.; Milonas, P.G.; Puggioli, A.; Pajović, I.; Petrić, D.; Bellini, R.; et al. Quality Control Methods for *Aedes albopictus* Sterile Male Transportation. *Insects* **2022**, *13*, 179. <https://doi.org/10.3390/insects13020179>

Received: 29 December 2021

Accepted: 6 February 2022

Published: 9 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

wild females. Both mating propensity and mating competitiveness for wild virgin females was higher for the wild, control males compared to the sterile, transported ones. Overall, the performance of sterile male *Ae. albopictus* delivered from the mass rearing facility of Italy to Greece in approximately 24 h was satisfactory. Transportation lasting two days or longer incurred detrimental effects on males, which called into question the outcome of the SIT release programs. In conclusion, our results demonstrate the need of quality control procedures, especially when sterile male production facilities are not near to the releasing point. Transportation could be a serious drawback for the implementation of Sterile Insect Releases and, consequently, it is important to establish an efficient and fast transportation of sterilized males in advance.

Keywords: Sterile Insect Releases Technique; mosquito control; mass rearing; shipping; invasive mosquito species

1. Introduction

The Sterile Insect Technique (SIT) is an environmentally friendly method for insect population management (suppression, eradication, and prevention of establishment) that involves the mass rearing and release of large numbers of sterilized males in the wild [1–5]. Sterile males' mate with wild feral females that subsequently lay infertile eggs, gradually decreasing the reproduction rates of wild populations. Hence, under the assumption that enough competitive sterile males are released for several weeks, the local wild population can be substantially suppressed and even eradicated [6–8].

Apparently, the success of an SIT project depends on the ratio of released sterile males to wild males and, if the quality of the sterile males is low, then the efficacy of SIT is reduced [9,10]. Most SIT programs employ releases of large quantities of sterilized males that outnumber the wild males ("overflooding ratios"). The costs and labor associated with insect production would be prohibitive for many operations and a balance must be reached which ensures that enough sterile males are produced and released at the lowest cost possible [8,11]. Additionally, the negative effects of radiosterilization on mating capacity and on longevity can be minimized by adjusting the timing of irradiation and the dose [9,12,13]. Earlier studies in fruit flies (Diptera: Tephritidae) have shown that both irradiation at high doses to achieve high rates of sterility [14–16] and mass rearing reduce the sexual competitiveness of sterile males in contrast to wild ones [15,17]. Besides the negative effects of mass production and sterilization on the quality of sterile males, transportation to release sites may induce an additional stress and, hence, deterioration of the quality. Several aspects of transportation, such as the means of transportation, duration and ambient condition need to be considered, in order to disentangle the possible negative effects on the performance of delivered males.

The quality attributes of the released sterile males include the ability to survive and disperse in the wild, locate and find a mate, perform sexual courting, mate and transfer sperm and ultimately induce sterility and refractoriness to mated/re-mated females [18]. These quality attributes can be assessed during mass rearing and before their release, and indeed there are several developed protocols for different target species available [11,19–21]. Most of the established protocols concern species with a long history in SIT, such as fruit flies, the tsetse fly (*Glossina austeni* Newst.), and the screw worm (*Cochliomyia hominivorax* Coquerel) [1–5].

Since its successful use for many agricultural pests, SIT is now proposed and evaluated to address pests of importance in public health, such as mosquitoes [22,23]. Past efforts for the control of mosquitoes using the SIT partially failed because of the low competitiveness and general performance of the sterile males compared to the wild ones [24–26]. Recent SIT efforts target invasive mosquito species, such as *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) and *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus), which are major vectors of diseases, such as the

Zika and Dengue virus [27,28]. New techniques in mass rearing and sterilization have been developed that substantially improve the quality of sterile male mosquitoes.

Standard quality control tests (QC) have been developed for numerous insect species where SIT has been applied [29]. Quality control tests may include traits to assess proportion of emergence, flight ability, stress resistance, longevity and mating competitiveness with a goal to predict the performance of the sterile insects in the wild. The quality of the sterile mosquitoes can be assessed in laboratory, semi-field and field conditions [30,31]. Standard QC procedures in most advanced SIT programs include the insect's ability to fly out of simple tube devices [32–35]. Balestrino et al. [29] developed and validated new tools designed to infer the quality of *Ae. albopictus* sterile males through the observation of their flight ability after stress treatments (different aspiration powers and times) in a 'flight organ device'. Results have shown a correlation between flight ability, survival and mating capacity. Culbert et al. [36] improved the device, which was tested on *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*, showing enough sensitivity to detect the effects of irradiation, chilling, and compaction.

Since there is lack of information on the quality of males transported from the rearing facilities by air cargo shipment to distant areas and often countries where they are released [37], the current paper presents a list of tests to assess the quality of transported sterilized males. More specifically, we describe the experimental procedures that test whether transportation under realistic SIT operation programs affect the quality of the released males.

2. Materials and Methods

Several QC tests were organized and performed in Italy (mass production facility, Crevalcore, Bologna), Greece and Montenegro (Figure 1). Initially, we assessed the residual fertility of produced sterilized males (Italy) and then we evaluated the effect of transportation on male survival and flight ability (Greece, Montenegro). After finding the optimum transportation density we further evaluated (Greece): (a) the effect of mating, food and water stress on male survival; and (b) the male mating performance. Due to different custom procedures between European Union (EU) and non-EU countries, the duration of transportation and its effect on mortality rate was also recorded for transportations from Italy to Greece, (EU country) and to Montenegro (non-EU country).

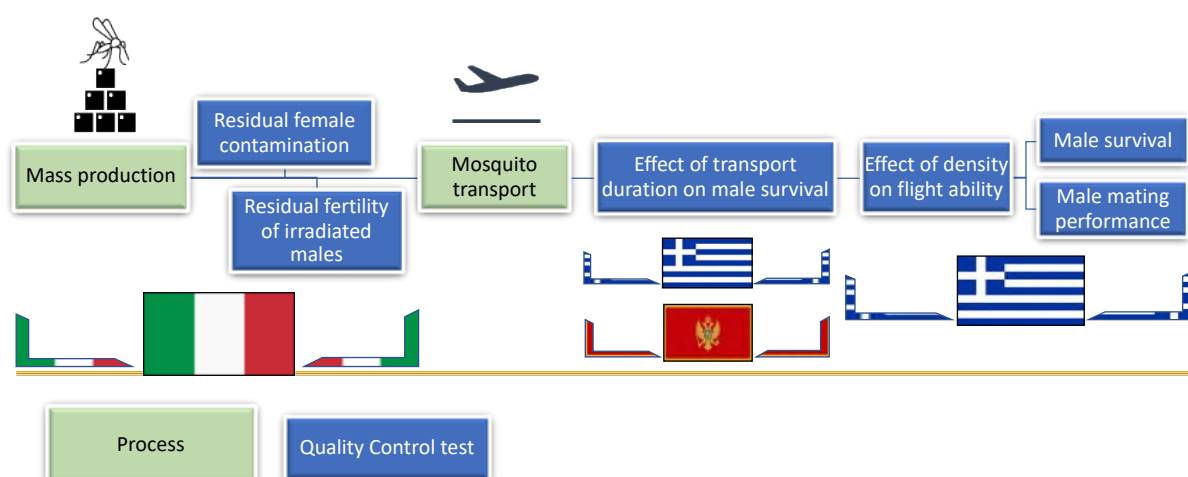


Figure 1. Flow diagram outlining of the processes from mass production to transport and the respective Quality Control (QC) tests performed. The flags of Italy, Greece and Montenegro indicate the activities conducted in respective states.

2.1. Mosquito Strains

2.1.1. Mass Rearing of *Aedes albopictus*

All males used in these trials originated from *Ae. albopictus* field collected eggs from Greece (Vravrona), Montenegro (Radovići) and Italy (Rimini) (GR, MNE and RER strain, accordingly). Colonies were established in the BSL3 laboratory of the Medical and Veterinary Department of the Environmental and Agriculture Centre “G. Nicoli” in Crevalcore (CAA) (Bologna, Italy). Adult mosquitoes were reared at standard conditions (28 ± 1 °C, 85 ± 5 % RH, 14:10 h L:D photoperiod) in plexiglas cages (40 cm × 40 cm × 40 cm) and were fed constantly on a 10% sucrose solution [38]. Females were offered fresh swine blood every week, using a Hemotek® membrane feeding system (thermostat-controlled device by Hemotek Ltd., Great Harwood Business Zone, Blackburn) [38]. Eggs laid on wet filter paper were removed from the adult plexiglass cages and placed in sealed plastic boxes to permit embryonation. When needed, larvae were obtained using standardized hatching procedures and reared at standard conditions inside white plastic trays (41 cm × 31 cm × 11 cm) containing 2 L of deionized water, 4000 larvae fed with 2.0 mg/larva of the International Atomic Energy Agency (IAEA, Vienna, Austria) standard diet integrated with brewer yeast (IAEA-BY) administered daily for four days after hatching [29].

2.1.2. *Aedes albopictus* Greek Population (Control)

In addition to the males which were transported and used in a series of experiments, we also used a wild Greek population which originated from eggs collected in Athens using ovitraps (Vravrona strain, the same used for mass production in Italy; Bellini et al. [39] as a non-treated control (neither irradiated, nor transported). Egg batches were collected daily and kept sealed in the laboratory of the Benaki Phytopathological Institute (BPI) (Kifissia, Greece) or transported to the laboratory of Agricultural Zoology at the University of Thessaly (UTH) (Volos, Greece, driving distance 3 h from BPI). Before trials, eggs were submerged in stale tap mineral water for hatching and rearing [37,40–42]. The flight ability tests were conducted at BPI, whilst for the survival and mating performance tests (effect of mating, food and water stress on male survival and male mating performance) eggs (in oviposition substrates) were transported to UTH and reared there to serve as the respective controls in various tests.

2.2. Sexing and Irradiation

Sex separation (male pupae) from the three mass reared populations (GR, MNE, RER), was based on pupae size and was conducted using metal sieves with square meshes of 1400 µm [38,43], 24–30 h from the beginning of pupation. The collected pupae were aged for an additional 24 h and then divided into batches of 5000 pupae and transferred into plastic containers of 1000 mL capacity, filled with 500 mL of tap water. These containers were used to transport the pupae to the Medical Physics Department of the St. Anna Hospital (Cona, Ferrara, Italy) for irradiation and, afterwards, back to the laboratory for adult emergence and packaging [44]. During the night before irradiation, as well as during transportation to irradiation, the pupae were maintained in a thermal insulated plastic container to maintain a temperature of about 20–22 °C. Few adult males may emerge during transportation of the pupae to/from the irradiation.

Irradiation of pupae were performed by using an IBL 437 irradiator (CIS Bio International, Bagnols-sur-Cèze, France) equipped with a 50.9 TBq Cs-137 linear source with a central dose rate of 1.8 Gy/min [44]. Pupal batches were transferred with water into petri dishes (12 cm diameter) and were piled inside a dedicated canister for irradiation. The gamma ray dose of 35 Gy was administered to the pupae, at the time aged about 24–48 h. The dose distribution inside the basket has been recently checked using GAFCHROMIC EBT3 self-developing dosimetry films (International Specialty Products, Wayne, NJ, USA).

For the estimation of the sex ratio of the selected pupae, a sample of 300 pupae were sexed individually under a stereomicroscope using morphological characters [45].

2.3. Residual Fertility of Irradiated Males

The residual fertility of all strains was checked under laboratory conditions at CAA. Irradiated male pupae were placed in cages with virgin, non-irradiated conspecific female pupae of the same strain. As a control, non-irradiated male pupae from each strain were also caged with conspecific virgin females. The male and female pupae used for these experiments were checked and sexed individually under a stereomicroscope [46,47].

Different replicates were performed per strain and gonotrophic cycle using cages with 100 males and 100 females with constant access to a 10% sucrose solution. Blood meals were offered to the females on day 7 and day 14 from adult emergence (two gonotrophic cycles). Eggs laid on filter papers were collected five days after blood feeding, left to dry slowly and stored at high humidity for at least one week before hatching. The eggs collected were counted under a stereomicroscope and hatched overnight in bacterial broth solution [44]. After submersion, the egg papers were checked under the stereomicroscope to count the hatched and unhatched eggs.

2.4. Direct Effects of Transportation on Sterile Males

2.4.1. Direct Effect of the Duration of Transportation on Survival

Transport from the CAA mass production facility (Crevalcore, Italy) to Athens (Greece) and Podgorica (Montenegro) of sterilized males of the respective strains was conducted by air shipment. Adults were sent in chilled foam boxes (around 1500 sterilized males/box: temperature 8–14 °C) covered with net and a cotton fiber wet with a 10% sugar solution and ice packs [37]. To evaluate the direct effect of transportation duration, upon arrival we counted the number of dead males per shipment in both countries. The transportation period for Montenegro was May–June 2018 and for Greece August–September 2018.

2.4.2. Effect of Density during Transportation on Flight Ability

Sterilized males (GR strain) were transported from Italy to Greece in three different densities: 1200, 1500 and 1900 males/chilled foam box. As the control, non-irradiated and non-transported males of the same age (3–4 days) originating from the Greek control colony maintained at the BPI facility were used. Upon arrival, sterilized males were transferred to constant laboratory conditions (25 ± 2 °C, 80% RH) in the BPI laboratory and fed ad libitum with 10% sugar solution for five hours. The control males were kept in the same conditions.

Flight ability tests were conducted using the aspirator device and the methodology described by Balestrino et al. [29]. Twenty males from each of the four density regimes and the laboratory control males were transferred to each suction tube. The aspiration time was set at 30 min, while 10 and 15 replicates were performed for sterilized and control males, respectively. This stress test can measure possible biological stress conditions and it was selected as an easy and rapid method compared to other methods [36].

2.5. Post Transportation Survival and Mating Performance

Experiments were conducted at constant conditions (25 °C, 65% RH, 14:10 L:D) in the laboratory of Entomology and Agricultural Zoology at UTH. The photophase was set from 07:00 to 21:00 with 45 min increasing/decreasing light intensity at dawn and dusk respectively.

2.5.1. Effect of Mating, Food and Water Stress on Male Survival

Effect of Mating on Male Longevity

To determine the effect of mating on male longevity, both virgin wild and sterilized males were allowed to mate with wild virgin females. To do so, 40 either sterilized or wild males were placed in a BugDorm[®] cage together with 40 virgin females. Three such cages (replicates) were set up for each male type. Adults of both sexes were confined together for six days to allow mating. On the seventh day, 50 randomly chosen males of each category (from all three replicates) were transferred with an aspirator into individual cages, having

access to a 5% sugar solution. Fifty males of both types (wild and sterilized) having no access to females and kept in similar crowding density conditions (80 males per cage) for six days were included in our trials as the respective unmated controls. Individual adult cages were constructed of a transparent, 400 mL capacity plastic cup that was placed upside down and fixed on the lid of a 9 cm diameter petri dish. A side window (3 cm × 5 cm) served for ventilation, while a small hole on the top of the cage provided the entrance to the cage. Adult food (5% sugar solution) was provided by a cotton wick that went through the base of the cage to the underneath base of the petri dish. Male mortality was recorded daily until the death of the last individual.

2.5.2. Effect of Food and Water Starvation on Adult Survival Rates

The following three treatments were tested: (a) food starvation (males kept with only water), (b) food and water starvation (neither food nor water offered to males), and (c) control (both food and water offered ad libitum to males). Sterilized males were placed in individual cages (see above) upon arrival in the laboratory. Wild males of the same age (four days old) were placed in the same cages as well. Sterilized and wild males were randomly assigned to one of the three treatments (50 individuals per treatment). Mortality was recorded twice a day until the death of the last individual.

2.6. Male Mating Performance

2.6.1. Mating Propensity and Daily Patterns of Mating Frequency of Wild and Sterilized Males

To choose the appropriate time interval of the day to perform both mating propensity and mating competitiveness tests we recorded the daily patterns of mating in a “no choice” experimental set up. Before being tested, batches of virgin sterilized males, virgin wild males and virgin wild females were kept separately in standard BugDorm-4F2222 cages at approximately 80 adults per cage, and provided with a 5% sugar solution. All adult mosquitoes were reproductively mature (6–12 days old). Mating arenas consisted of a transparent Plexiglass® cage (15 cm × 15 cm × 15 cm, custom made) with ample adult food (sucrose solution 5%). In each mating arena, one female was placed in the plexiglass arena the evening before the test for acclimation to the environment and one male was introduced just before the start of the observation. The total number of copulations, as well as the duration and the latency of the first copulation (time until the first copulation) and of every next one (from the end time of the previous copulation until the start time of the new one), were observed for three time periods set during the photophase (08:00–12:00, 12:01–16:00, 16:01–20:00). For each time period we conducted 30 replicates. To compare the mating propensity between the wild and sterile males we combined the data of the three time periods for both mating success and mating characteristics (i.e., latency and mating duration time).

2.6.2. Male Mating Competitiveness

The mating competitiveness of the sterile vs wild males were conducted using five to ten days old virgin males. Each test involved virgin sterile males, virgin wild males and virgin wild females at a ratio of 1:1:1. Tests were conducted in the Plexiglass mating arenas (see above) from 18:00 to 20:00 based on earlier observation regarding daily patterns of the mating activity. Males were marked with a florescent powder before mating. We ran 98 replicates and matings were visually recorded by experienced personnel. In half of the replicates the sterile male was colored with powder non-toxic dye and in the other half of them the wild male was colored. Hence, we conducted (a) 49 replicates with one female/one non-colored sterile male/one colored wild male and (b) 49 replicates with one female/one colored sterile male/one non-colored wild male. The wild female was set in the testing arena one day before the test day for acclimation and the males (sterile and wild) were introduced together at the start of the experiment. We recorded the duration and the latency to first mating (time between the introduction of the males in the arena until the

first mating) and for every next copulation formed (end time of the previous copulation until the start time of a new copulation with the same individual).

2.7. Statistical Analysis

General linear model (GLM) followed by the Tukey's HSD test for post-hoc comparisons of means was used to test differences among strains (GR, MNE, RER) in residual female contamination following the mechanical sex separation of the pupae. Likewise, the effect of the mosquito strain, the level of irradiation and the gonotrophic cycle on egg hatch rate was investigated with GLM. Residual fertility rates were corrected with Abbott's correction formula [48]. One-way ANOVA was used to test the effect of mosquito density during transportation on flight ability. Survival analysis was considered to test whether the response (time to death) of wild and sterilized males to food and water starvation was differed. The log-rank test (Mantel–Cox) was used to compare the two groups of males. The effects of male type (wild, sterilized) and mating (mated, non-mated) on male longevity was assessed using the Cox proportional hazards model. Pairwise comparisons were conducted using the log rank (Mantel–Cox) test. Chi-square tests was used to separate rates of matings between wild and sterilized males in no choice mating tests and in choice mating tests. For all analyses the significance level was set at $\alpha = 0.05$. Data analysis was performed using IBM SPSS 25 (IBM Corp., Armonk, NY). The Ms Excel and ggplot in RStudio v1.1.453 (RStudio 2012, R Foundation of Statistical Computing, Vienna, Austria) were used to plot graphs.

3. Results

3.1. Residual Female Contamination

The female contamination observed in the male pupae, following mechanical sex separation, did not differ as a function of the different strain used ($F_{2,14} = 0.425$, $p = 0.662$). The mean percentage ($\pm$ SE) of the residual presence of females obtained with the RER, GR and MNE strains was equal to 1.62% (± 0.32), 1.25% (± 0.26) and 1.18% (± 0.39) of the total number of pupae selected, respectively.

3.2. Male Residual Fertility

No difference in the fertility of *Ae. albopictus* females as a function of the strain ($F_{2,81} = 1.5$; $p = 0.23$) and gonotrophic cycle considered ($F_{1,81} = 0.03$; $p = 0.86$) were detected. However, irradiation of males had a significant effect on female fertility ($F_{1,81} = 3508$; $p < 0.001$). The overall mean ($\pm$ SD) residual fertility measured by egg hatch was significantly lower (0.008 ± 0.007) than the recorded fertility in the untreated control group (0.831 ± 0.089) (Table 1).

Table 1. Residual fertility (Abbott's corrected) of eggs laid by *Aedes albopictus* females mated with conspecific males irradiated as pupae at 35 Gy. Strains: Greece (GR), Montenegro (MNE) and Italy (RER).

Strain	Trials	N	Total No Eggs Checked	Average Residual Fertility (Eggs Hatched/Eggs Oviposited + SD)	
				Control	Irradiated
RER	1	10	30,927	0.834 ± 0.059	0.007 ± 0.008
	2	10	28,978	0.842 ± 0.096	0.006 ± 0.003
GR	1	5	6378	0.820 ± 0.187	0.013 ± 0.012
	2	5	6530	0.768 ± 0.053	0.008 ± 0.008
MNE	1	6	14,398	0.841 ± 0.043	0.010 ± 0.003
	2	7	19,776	0.864 ± 0.070	0.009 ± 0.003
Overall	-	43	106,987	0.831 ± 0.089	0.008 ± 0.007

3.3. Direct Effect of the Duration of Transportation on Sterilized Male Survival

The time of transportation required to deliver males to Montenegro was approximately two days, while the delivery to Greece was approximately one day, and this led to a

significant higher mortality rate (t -test, $p < 0.05$) in the male mosquitoes transported to Montenegro (Table 2).

Table 2. The effect of duration of transportation on irradiated male mosquito mortality (around 1500 sterilized males/box).

Duration of Transportation (Hours)	Destination Country	No of Shipment (Trial)	No of Males Shipped/Trial	Average No of Males ($\pm$ SE)	Mortality during Transportation (%)	Average Mortality ($\pm$ SE) ^a
48 ± 2	Montenegro	1	15,000	$17,400 \pm 993$	78.16	$39.83 \pm 10.01a$
		2	22,000		53.31	
		3	20,000		89.38	
		4	15,000		72.65	
		5	15,000		15.83	
		6	21,000		13.72	
		7	15,000		32.92	
		8	16,000		9.41	
		9	20,000		14.55	
		10	15,000		8.39	
22 ± 2	Greece	1	15,000	$13,880 \pm 884$	12.7	$15.66 \pm 2.75b$
		2	18,000		16.8	
		3	15,000		15.1	
		4	19,000		24.9	
		5	12,000		5.0	
		6	15,000		10.4	
		7	17,000		24.7	

^a Means followed by the same letter do not differ significantly (Welch's t -test, $p = 0.05$).

3.4. Effect of Density during Transportation on Flight Ability of Sterilized Males

The proportion of males initiating flight was higher in control males compared to sterilized ones, regardless of the density of mosquitos during transportation ($F_{3,41} = 16.2$, $p < 0.001$), while no differences were found among the three densities of transportation (Figure 2, Tukeys' HSD tests, $p > 0.05$).

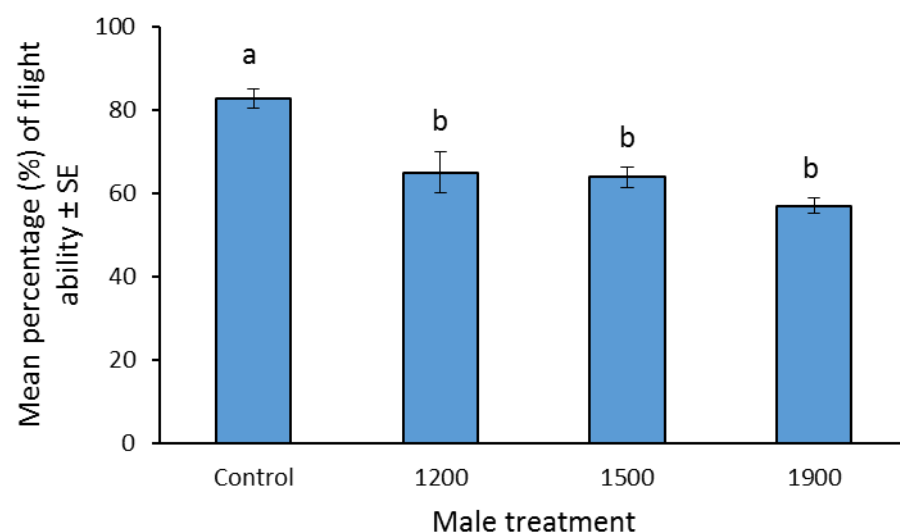


Figure 2. Flight ability of sterilized *Aedes albopictus* males shipped at different densities and the wild non-shipped, fertile males of the control population. Different letters indicate significant differences (Tukey's HSD test, $p < 0.005$).

3.5. Effect of Mating, Food and Water Stress on Male Survival Post Transportation

Both wild and sterilized males had similar life spans under the conditions of food starvation (log rank test, $p > 0.05$) (Table 3). However, wild males live longer than sterilized ones under both food and water starvation (log-rank test, $p < 0.05$) (Table 4).

Regardless of mating status, the lifespan of wild males was no longer than that of the sterilized ones (Table 5 and Figure 3). On the other hand, mating did not have an apparent effect on males' longevity. Likewise, the interaction between male type and mating was not significant, indicating that the effects of mating were similar on the two male types.

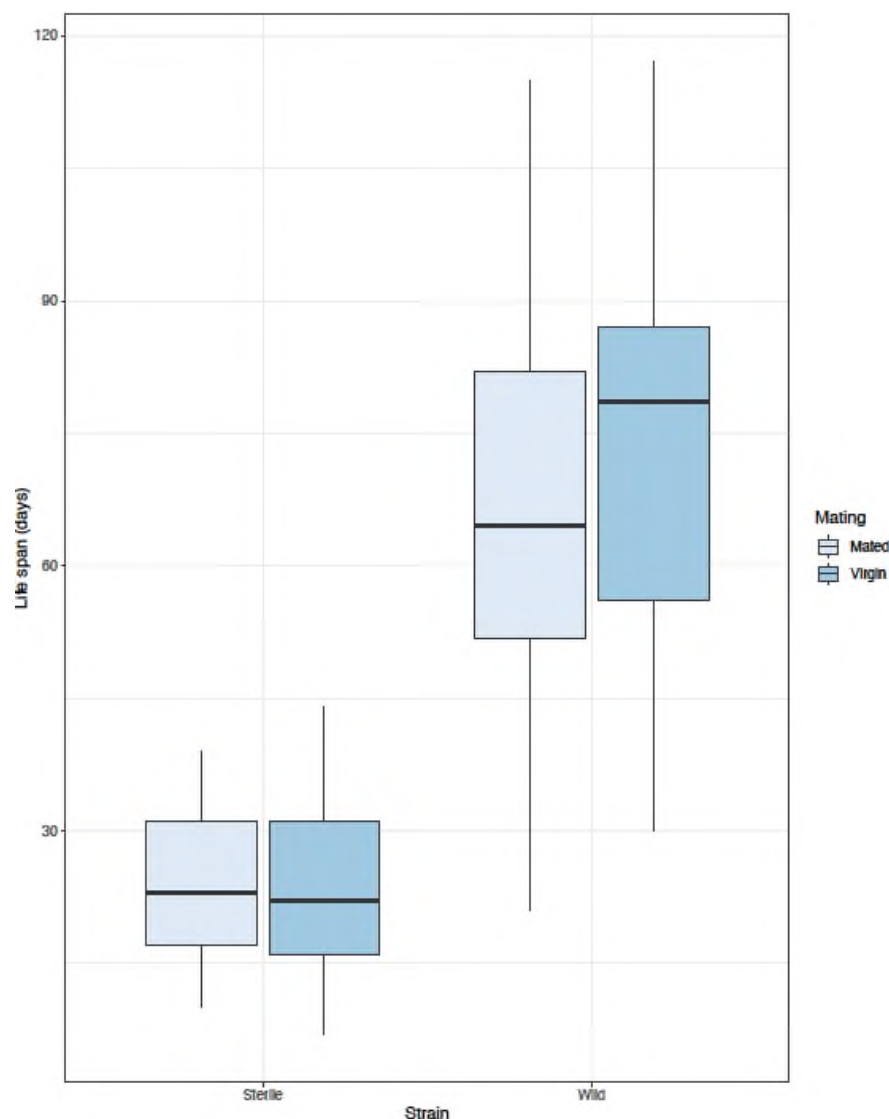


Figure 3. Box plots depicting the effect of male type (wild or sterilized) and mating status (mated or virgin) on longevity of males.

Table 3. Response (time to death) of wild and sterilized *Aedes albopictus* males under food stress conditions (only water).

Type of Male	Average Life Span (Days)	Quartiles (Days $\pm$ SE)		
		25	50	75
Wild (n = 50)	5.40 $\pm$ 0.56 a	6.00 $\pm$ 0.83	4.00 $\pm$ 0.50	3.00 $\pm$ 0.38
Sterile (n = 50)	5.98 $\pm$ 0.32 a	7.00 $\pm$ 0.35	6.00 $\pm$ 0.50	5.00 $\pm$ 0.49

Different letters indicate significant differences (pairwise comparisons, log rank test, $p > 0.05$).

Table 4. Response (time to death) of wild and sterilized *Aedes albopictus* males under food and water starvation.

Type of Male	Average Life Span (Hours)	Quartiles (Days $\pm$ SE)		
		25	50	75
Wild (n = 50)	36.24 $\pm$ 1.47 a	48.00 $\pm$ 1.25	36.00 $\pm$ 1.69	24.00 $\pm$ 0.00
Sterile (n = 50)	31.92 $\pm$ 1.35 b	36.00 $\pm$ 1.55	36.00 $\pm$ 1.40	24.00 $\pm$ 1.84

Different letters indicate significant differences (pairwise comparisons, log rank test, $p < 0.05$).

Table 5. Variables of the Cox proportional hazards model regarding effects of male type and mating on the adult lifespan.

Source of Variation	β ¹	SE ²	Exp(β) ³	p ⁴
Male type	−3.95	0.39	0.01	<0.001
Mating status	−0.26	0.22	0.76	0.23
Mating status $\times$ Male Type	0.52	0.30	1.69	0.08

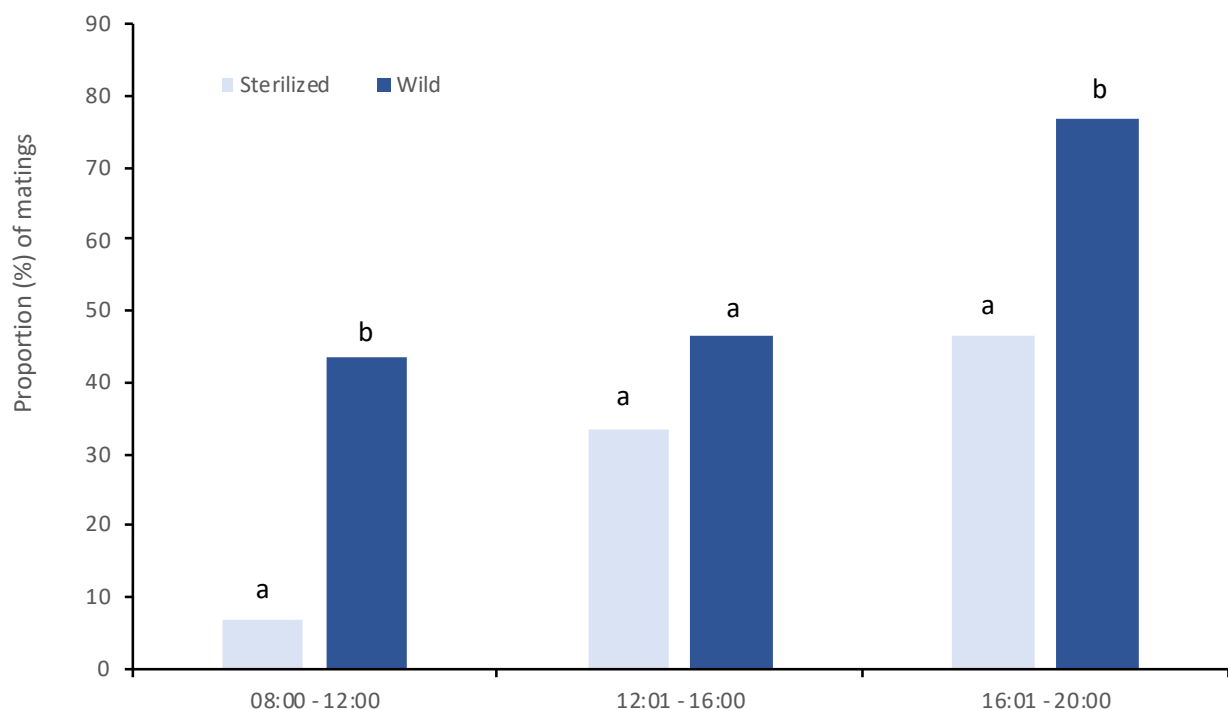
¹ β estimated coefficients in the Cox proportional hazards regression model, ² SE standard error of the coefficients,

³ Exp(β) exponential of an estimated regression coefficient, ⁴ p value in the Cox hazard ratio analysis.

3.6. Male Mating Performance Post Transportation

3.6.1. Daily Patterns of Mating Frequency of Wild and Sterilized Males

Both wild and sterilized males exhibited higher rates of mating in late afternoon and evening hours (Figure 4). Wild males mated at higher rates early in the morning and late in the afternoon compared to the sterilized ones ($\chi^2 = 10.75$ and 5.71 respectively, $df = 1$, $p < 0.05$). Mating proportions were similar between wild and sterilized males at noon ($\chi^2 = 1.11$, $df = 1$, $p > 0.05$). Overall, wild males mated at higher rates than sterilized ones, independently of the time period.

**Figure 4.** Daily patterns of mating for wild and sterilized males when wild virgin females were offered in a no choice experimental set up. Different letters indicate significant differences within each time interval ($p < 0.05$).

The duration of mating for both wild and sterilized males and for all three time periods is given in Figure 5. Despite a trend for longer mating duration during morning hours for the sterilized males, no differences were reported when all three time intervals were included in the analysis (t -test = 0.049, df = 178, p < 0.05).

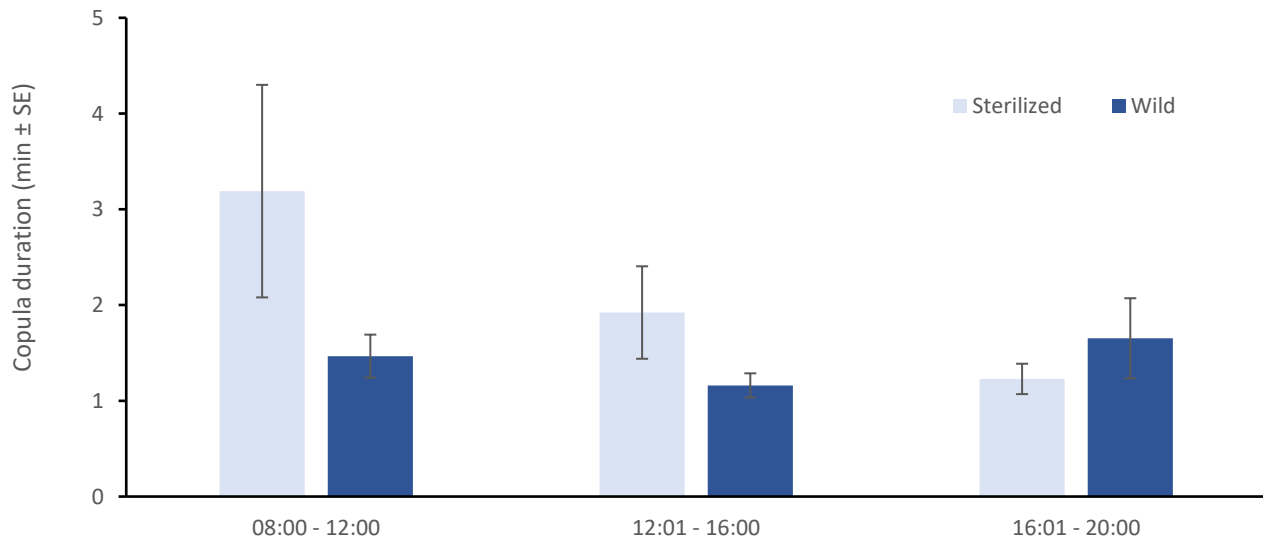


Figure 5. Effect of time of the day on copulation duration for wild and sterilized males when wild virgin females were offered in a no choice experimental set up.

3.6.2. Mating Propensity

Combining data of the three time periods above, it was found that wild males mated at a higher (almost two-fold) proportion compared to sterilized ones under the no choice experimental set up. In total 90 replicates were considered for each male group. Fifty and 26 females out of 90 were mated with the wild and the sterile males, respectively (55% and 28% mating for each male group, respectively, Table 6). The latency to mate was substantially but not significantly longer for the sterilized males compared to wild ones. Likewise, the mating duration was similar in the two types of males.

Table 6. Mating propensity of sterilized and wild *Aedes albopictus* males in no choice experiments involving wild virgin females.

Male Type	N	Mating (%)	Latency (min ± SE)	Duration (min ± SE)
Wild	90	55.56 a	75.18 ± 10.07 a	1.46 ± 0.20 a
Sterile	90	28.89 b	105.34 ± 15.07 a	1.64 ± 0.23 a
Test		$\chi^2 = 13.1$	t -test = 1.704	t -test = 0.545
df	-	1	74	74
p	-	<0.001	0.093	0.587

Values in each column followed by the same letter do not differ significantly $p \geq 0.05$.

3.6.3. Mating Competitiveness

Mating with either a wild or a sterilized male was recorded in 71.4% of the test cages (98 in total). Virgin females mated at higher rates with wild non sterilized males compared to sterilized ones (Table 7). The latency to mate was shorter for the sterilized males compared to wild ones, while mating duration was similar for the two types of males.

Table 7. Mating competitiveness of sterile and wild *Aedes albopictus*. In total 98 replicates were considered.

Male Type	N	Mating (%)	Latency (min ± SE)	Duration (min ± SE)
Wild	48	67.6 a	37.23 ± 4.38 a	0.85 ± 0.11 a
Sterile	23	32.4 b	23.22 ± 3.84 b	0.78 ± 0.07 a
Test	-	$\chi^2 = 8.8$	$t\text{-test} = 1.95$	$t\text{-test} = 0.40$
df	-	1	69	69
p	-	<0.01	0.02	0.32

Values in each column followed by the same letter do not differ significantly $p \geq 0.05$.

4. Discussion

The quality of sterile males is an important parameter for the success of an SIT program. In this study we assessed some parameters contributing to the quality of sterile *Ae. albopictus* males. Currently there is much interest for managing urban populations of *Ae. albopictus* with SIT and our study is aligned with initiatives of the International Atomic Energy Agency (IAEA), the INFRAVEC2 project and AIM-COST Action CA17108 aiming to enhance the capacity to integrate SIT in the effective management of invasive *Aedes* mosquitoes. In this study different mosquito populations were sampled as eggs from the targeted areas, sent for mass rearing and sterilization in a specialized facility in Italy and tested in the trial areas in Greece and Montenegro. Hence, the effect of mass rearing sterilization and transportation have been considered in our trials. One important aspect for the SIT program is the sexing (separation of males from females) of insects. In our study, the mechanical sex separation method applied allowed a residual presence of females of around 1.35% (± 0.21), which is still slightly higher than in the case of large SIT programs based on WHO [49]. Moreover, the impact of these released sterile females has been studied recently in Dumont et al. [50] when viruses are not circulating, releasing sterile females is not really an issue, while it is an issue when viruses (e.g., Dengue, or Chikungunya virus) are circulating.

The performance of the sterile males is influenced by a combination of factors: rearing conditions, sexing procedure, radiation dose and method, and packaging condition during transportation. The mass rearing of *Aedes* mosquitoes may induce developmental changes that affect body size, response to environmental stress and reduced male sexual performance and insemination ability [51–54]. *Aedes albopictus* colonies can maintain integrity and quality if there is sufficient genetic variation in mass rearing conditions resulting from optimized rearing conditions [55]. The optimal irradiation dose is determined experimentally by dose-response curves [44]. Our results confirm the high sterilization level obtained on adult mosquito males irradiated with a dose of 35 Gy at the pupal age of 24–40 h. The different European populations of *Ae. albopictus* tested have similar sensitivity to the gamma radiation dose used, without variation as a function of the different gonotrophic cycle of females considered. Hence, it seems that irradiation induces universal effects on different *Ae. albopictus* strains.

Shipping can also have a negative influence on the sterile insect quality [56]. Shipping requires the chilling and packaging of sterile males at high densities, which can have a marked influence on their quality [26,56]. Our findings indicate that transportation lasting two days or longer, such as the one from Italy to Montenegro, has a marked direct negative effect on the survival of sterile male mosquitoes, when compared to shorter transportation, such as the one from Italy to Greece (20–24 h). This result highlights the need for a harmonized process regarding the international framework for the trade of sterile male mosquitoes involving agreement among the involved authorities [57,58].

Moreover, transported sterile males results in a reduced flight ability compared to the wild ones, as assessed by flight apparatus used in similar trials [29]. On the other hand, density in the range of 1200–1900 males per container did not influence the survival rate and flight ability of shipped mosquitoes, which is positive for the logistics of SIT programs. Similarly, compaction did not significantly affect the survival of sterile *Anopheles arabiensis* males [59].

The sterile males shipped to Greece lived for a significantly shorter time than the wild ones at conditions of total starvation. This test serves as an index of nutritional reserves present in the males at after the time of release (FAO/IAEA/USDA 2019). On the other hand, provision of water, which is a more realistic scenario in natural conditions, led to equal survival rates of sterile and wild mosquitoes, indicating that, despite the stress caused by transportation, sterile males can still live long enough.

The interpretation of tests assessing the mating propensity (ability) of sterile male mosquitoes should consider their mating system (behavior) as well as the conditions of mass rearing. *Ae. albopictus* mating behavior is characterized by several rather small male aerial swarms where male competition take place and allows for female choice [60,61]. In our tests it was determined that wild males were more eager to mate than sterile males; however, this finding might not be representative of male performance when they encounter wild females in the field, because, in our experiments, females were reared in the laboratory and tests were conducted in confinement [62].

Nevertheless, when sterile mosquitoes directly competed with wild ones for mating to females, the latter were two times more successful. This can be in part attributed to sterilization, in part to mass rearing and in part to handling/shipping. The latency to mate was similar for non-sterile males when compared to sterile ones. The non-significant difference is attributed to high variability (range from 1 to 231 minutes). The selection for rapid matings of male mosquitoes in high density mass-rearing conditions has been demonstrated earlier [62]. Under the artificial rearing conditions, the “domestication” effect could lead to major changes of behavioral and physiological traits. This phenomenon is well known when insects are mass produced under laboratory conditions which are different (high crowding) from those to which the species is adapted in the field [62] and references therein).

Previous studies on establishing quality control methods for sterile *Ae. albopictus* included flight tests with an aspirator device to assess tolerance to mechanical and desiccation stresses, as well as male mating capacity, however they did not directly compare the mating competitiveness of sterile vs wild males [27]. Our trials indicate that sterile male mosquitoes have a reduced performance when compared with non-sterilized males, but they should be interpreted with caution, especially in assessing factors, such as mate propensity/competitiveness. Competitiveness tests that are carried out in large field enclosures may be more representative of real field condition [63]. For *Ae. Albopictus*, a previous study [60] determined that the mean CIS index (capacity to induce sterility index or competitiveness index) in the field strongly varied in space and time, ranging from 0.02 to 0.37, which indicates that the sterile males were 3 to 50 times less competitive than the wild males. Madakacherry et al. [11] found that the sterile males were equally competitive with their unirradiated counterparts, and a 5:1 ratio was sufficient to reduce, but not eliminate, the fertility of the female populations, irrespective of cage size.

Previous studies and the results presented herein indicate that irradiated male *Ae. albopictus* can effectively compete against fertile males, indicating that both the dose rate and the life stage at which the males are irradiated are near optimal [21,44,64]. However, given the increasing interest in adopting the SIT technology against the tiger mosquito globally, and the importance of standardized quality control, there are still more studies needed on the performance of sterilized males on the quality traits that were outlined earlier. In this study, all trials were conducted in 2018, before the beginning of the weekly releases in Greece aiming to check the quality of irradiated sterile male mosquitoes [37]. Thus, it is important to stress that our quality control procedures took place not near the mass production facility but in the target area of an SIT pilot study. This might be more relevant to quality control studies conducted at the mass rearing facility, since they include additional stresses related to shipping and handling.

5. Conclusions

Results of the current study indicate clearly that it is challenging to manage massive releases when sterile male production facilities are too far from the releasing point, especially when transportation of sterile males lasts longer than 24 h by air travel. The COVID-19 pandemic and its effects on transportation (flights delays or cancelling) further highlights the importance of establishing an efficient and fast transportation and timely delivery of the sterilized males. Quality Control (QC) processes are needed to ensure the feasibility of SIT control when shipments of sterile males are required. Quality Control trials should be conducted before shipping (at the production facilities) and after transportation (at the release area) to precisely partition the effects of irradiation/rearing/handling and that of transportation on male performance. To accommodate sterile male releases in distant areas, the development of a single *Ae. albopictus* mass rearing strain should be considered. To establish such a generic strain, propagules (genetic material) from different countries should be included. Apparently, the compatibility of the new established strain against local SIT target populations should be evaluated with extensive quality control tests. In conclusion, in the current study laboratory quality control protocols for sterilized mosquito males were applied to address, for the first time, the effects of shipment in the target area on the performance of sterilized males. The results provide useful baseline information for the implementation of SIT when sterile male production facilities are not near to the releasing point and shipment is required.

Author Contributions: Conceptualization, D.P.P., D.P., R.B., P.G.M., A.M. and N.T.P.; Data curation, G.D.M., A.K., G.K.B., C.I., I.P., A.P., N.T.P. and R.B.; Formal analysis, G.D.M., A.K., C.I., A.P. and N.T.P.; Funding acquisition, A.M., D.P., R.B. and N.T.P.; Methodology, G.D.M., A.K., G.K.B., C.I., D.P.P., P.G.M., A.P., I.P., D.P., R.B., A.M. and N.T.P.; Project administration, D.P., N.T.P., R.B. and A.M.; Resources, D.P.P., I.P., D.P., N.T.P., R.B. and A.M.; Supervision, D.P.P., D.P., R.B., A.M. and N.T.P.; Writing—original draft, G.D.M., A.K., N.T.P. and A.M.; Writing—review & editing, G.D.M., A.K., A.K., G.K.B., C.I., D.P.P., P.G.M., A.P., I.P., D.P., R.B., A.M. and N.T.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by: the project “A systematic surveillance of vector mosquitoes for the control of mosquito-borne diseases in the Region of Attica” financed by the Region of Attica; the project LIFE CONOPS (LIFE12 ENV/GR/000466) funded by the European Commission in the framework of the program LIFE + Environment Policy and Governance (www.conops.gr, accessed on 5 February 2022); the TC Project RER/5/022 “Establishing Genetic Control Programmes for *Aedes* Invasive Mosquitoes” financed by IAEA; the programme of Coordinated Research Activities “Quality control bioassays for irradiated *Aedes albopictus* males” (CRP Contract No: 23915), financed by IAEA, the EU-funded research infrastructure project Infravec2-Research infrastructures for the control of insect vector borne diseases (2017–2021). The work of G.D.M., G.K.B., I.P., D.P., R.B., A.M. and N.T.P. was done within the framework of AIM-COST Action CA17108. «This research is co-financed by Greece and the European Union (European Social Fund-ESF) through the Operational Programme «Human Resources Development, Education and Lifelong Learning» in the context of the project “Strengthening Human Resources Research Potential via Doctorate Research” (MIS-5000432), implemented by the State Scholarships Foundation (IKY)» The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data are available in the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Knippling, E.F. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *J. Econ. Entomol.* **1955**, *48*, 459–462. [\[CrossRef\]](#)
- Knippling, E.F. Agriculture Handbook No.512. In *The Basic Principles of Insect Population Suppression and Management*; U.S. Government Printing Office: Washington, DC, USA, 1979.
- Knippling, E.F. Role of parasitoid augmentation and Sterile Insect Techniques in areawide management of agricultural insect pests. *J. Agric. Entomol.* **1998**, 273–301.
- Krafsur, E.S. Sterile Insect Technique for suppressing and eradicating insect population: 55 Years and Counting. *J. Agric. Urban Entomol.* **1998**, *15*, 303–317.
- Dyck, V.A.; Hendrichs, J.; Robinson, A.S. *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2005.
- Klassen, W.; Curtis, C.F.; Hendrichs, J. History of the Sterile Insect Technique. In *Sterile Insect Technique*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2020.
- Alphey, L.; Benedict, M.; Bellini, R.; Clark, G.G.; Dame, D.A.; Service, M.W.; Dobson, S.L. Sterile-Insect methods for control of mosquito-borne diseases: An Analysis. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2010**, *10*, 295–311. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Oliva, C.F.; Benedict, M.Q.; Matilda Collins, C.; Baldet, T.; Bellini, R.; Bossin, H.; Bouyer, J.; Corbel, V.; Facchinelli, L.; Fouque, F.; et al. Sterile Insect Technique (SIT) against *Aedes* species mosquitoes: A roadmap and good practice framework for designing, implementing and evaluating pilot field trials. *Insects* **2021**, *12*, 191. [\[CrossRef\]](#)
- Robinson, A.S.; Cayol, J.P.; Hendrichs, J. Recent findings on medfly sexual behavior: Implications for SIT. *Fla. Entomol.* **2002**, *85*, 171–181. [\[CrossRef\]](#)
- Cayol, J.P.; Coronado, P.; Taher, M. Sexual compatibility in medfly (Diptera: Tephritidae) from different origins. *Fla. Entomol.* **2002**, *85*, 51–57. [\[CrossRef\]](#)
- Madakacherry, O.; Lees, R.S.; Gilles, J.R.L. *Aedes albopictus* (Skuse) males in laboratory and semi-field cages: Release ratios and mating competitiveness. *Acta Trop.* **2014**, *132*, S124–S129. [\[CrossRef\]](#)
- Andreasen, M.; Curtis, C.F. Optimal life stage for radiation sterilization of *Anopheles* males and their fitness for release. *Med. Vet. Entomol.* **2005**, *19*, 238–244. [\[CrossRef\]](#)
- Parker, A.; Mehta, K. Sterile Insect Technique: A model for dose optimization for improved Sterile Insect quality. *Fla. Entomol.* **2007**, *90*, 88–95. [\[CrossRef\]](#)
- Toledo, J.; Rull, J.; Oropeza, A.; Hernández, E.; Liedo, P. Irradiation of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) Revisited: Optimizing sterility induction. *J. Econ. Entomol.* **2004**, *97*, 383–389. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Rull, J.; Encarnacin, N.; Birke, A. Mass rearing history and irradiation affect mating performance of the male fruit fly, *Anastrepha Obliqua*. *J. Insect Sci.* **2012**, *12*, 45. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Rull, J.; Arredondo, J.; Diaz-Fleischer, F. Improved mating performance of male *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) irradiated at low doses for release in Sterile Insect Technique programmes. *Int. J. Trop. Insect Sci.* **2014**, *34*, S28–S34. [\[CrossRef\]](#)
- Lux, S.A.; Vilardi, J.C.; Liedo, P.; Gaggli, K.; Calcagno, G.E.; Munyiri, F.N.; Vera, M.T.; Manso, F. Effects of irradiation on the courtship behavior of medfly (Diptera, Tephritidae) mass reared for the Sterile Insect Technique. *Fla. Entomol.* **2002**, *85*, 102–112. [\[CrossRef\]](#)
- Partridge, L.; Ewing, A.; Chandler, A. Male size and mating success in *Drosophila melanogaster*: The roles of male and female behaviour. *Anim. Behav.* **1987**, *35*, 555–562. [\[CrossRef\]](#)
- Butail, S.; Manoukis, N.; Diallo, M.; Ribeiro, J.M.; Lehmann, T.; Paley, D.A. Reconstructing the flight kinematics of swarming and mating in wild mosquitoes. *J. R. Soc. Interface* **2012**, *9*, 2624–2638. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Dabiré, K.R.; Sawadogo, P.S.; Hien, D.F.; Bimbilé-Somda, N.S.; Soma, D.D.; Millogo, A.; Baldet, T.; Gouagna, L.C.; Simard, F.; Lefèvre, T.; et al. Occurrence of natural *Anopheles arabiensis* swarms in an urban area of Bobo-Dioulasso City, Burkina Faso, West Africa. *Acta Trop.* **2014**, *132*, S35–S41. [\[CrossRef\]](#)
- Oliva, C.F.; Jacquet, M.; Gilles, J.; Lemperiere, G.; Maquart, P.O.; Quilici, S.; Schooneman, F.; Vreysen, M.J.B.; Boyer, S. The Sterile Insect Technique for controlling populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) on Reunion Island: Mating vigour of sterilized males. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e49414.
- Dame, D.A.; Benedict, M.Q.; Robinson, A.S.; Knols, B.G. Historical applications of induced sterilisation in field populations of mosquitoes. *Malar. J.* **2009**, *8*, S2. [\[CrossRef\]](#)
- Kapranas, A.; Collatz, C.J.; Michaelakis, M.A.; Milonas, M.P. The role of Sterile Insect Technique within biologically-based pest control—An appraisal of existing regulatory frameworks. *Entomol. Exp. Appl.* **2021**. *accepted*.
- Renshaw, M.; Service, M.W.; Birley, M.H. Size variation and reproductive success in the mosquito. *Aedes cantans*. *Med. Vet. Entomol.* **1994**, *8*, 179–186. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ponlawat, A.; Harrington, L.C. Age and body size influence male sperm capacity of the Dengue Vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **2007**, 422–426. [\[CrossRef\]](#)
- Helinski, M.E.H.; Hassan, M.M.; El-Motasim, W.M.; Malcolm, C.A.; Knols, B.G.J.; El-Sayed, B. Towards a Sterile Insect Technique field release of *Anopheles arabiensis* mosquitoes in Sudan: Irradiation, transportation, and field cage experimentation. *Malar. J.* **2008**, *7*, 65. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

27. Zheng, X.; Zhang, D.; Li, Y.; Yang, C.; Wu, Y.; Liang, X.; Liang, Y.; Pan, X.; Hu, L.; Sun, Q.; et al. Incompatible and Sterile Insect Techniques combined eliminate mosquitoes. *Nature* **2019**, *572*, 56–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Lees, R.S.; Carvalho, D.O.; Bouyer, J. Potential impact of integrating the Sterile Insect Technique into the fight against disease-transmitting mosquitoes. In *Sterile Insect Technique*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2020.
29. Balestrino, F.; Puggioli, A.; Carrieri, M.; Bouyer, J.; Bellini, R. Quality Control Methods for *Aedes Albopictus* Sterile Male Production. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0005881. [[CrossRef](#)]
30. Bellini, R.; Albieri, A.; Balestrino, F.; Carrieri, M.; Porretta, D.; Urbanelli, S.; Calvitti, M.; Moretti, R.; Maini, S. Dispersal and survival of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) males in Italian urban areas and significance for Sterile Insect Technique application. *J. Med. Entomol.* **2010**, *47*, 1082–1091. [[CrossRef](#)]
31. Bellini, R.; Medici, A.; Puggioli, A.; Balestrino, F.; Carrieri, M. Pilot field trials with *Aedes albopictus* irradiated sterile males in Italian urban areas. *J. Med. Entomol.* **2013**, *50*, 317–325. [[CrossRef](#)]
32. Benedict, M.Q.; Knols, B.G.J.; Bossin, H.C.; Howell, P.I.; Mialhe, E.; Caceres, C.; Robinson, A.S. Colonisation and mass rearing: Learning from others. *Malar. J.* **2009**, *8*, S4. [[CrossRef](#)]
33. Carpenter, J.E.; Blomefield, T.; Vreysen, M.J.B. A flight cylinder bioassay as a simple, effective quality control test for *Cydia pomonella*. *J. Appl. Entomol.* **2012**, *136*, 711–720. [[CrossRef](#)]
34. FAO; IAEA; USDA. *Product Quality Control for Sterile Mass-Reared and Released Tephritid Fruit Flies*; International Atomic Energy Agency: Vienna, Austria, 2019.
35. Seck, M.T.; Pagabeleguem, S.; Bassene, M.D.; Fall, A.G.; Diouf, T.A.R.; Sall, B.; Vreysen, M.J.B.; Rayaissé, J.B.; Takac, P.; Sidibé, I.; et al. Quality of sterile male tsetse after long distance transport as chilled, irradiated pupae. *PLoS Negl. Trop. Dis* **2015**, *9*, e0004229. [[CrossRef](#)]
36. Culbert, N.J.; Balestrino, F.; Dor, A.; Herranz, G.S.; Yamada, H.; Wallner, T.; Bouyer, J. A rapid quality control test to foster the development of genetic control in mosquitoes. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 16179. [[CrossRef](#)]
37. Balatsos, G.; Puggioli, A.; Karras, V.; Lytra, I.; Mastronikolos, G.; Carrieri, M.; Papachristos, D.P.; Malfacini, M.; Stefopoulou, A.; Ioannou, C.S.; et al. Reduction in egg fertility of *Aedes albopictus* mosquitoes in Greece following releases of imported sterile males. *Insects* **2021**, *12*, 110. [[CrossRef](#)]
38. Bellini, R.; Calvitti, M.; Medici, A.; Carrieri, M.; Celli, G.; Maini, S. Use of the Sterile Insect Technique against *Aedes albopictus* in Italy: First results of a pilot trial. In *Area-Wide Control of Insect Pests: From Research to Field Implementation*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2007.
39. Bellini, R.; Michaelakis, A.; Petrić, D.; Schaffner, F.; Alten, B.; Angelini, P.; Aranda, C.; Becker, N.; Carrieri, M.; Di Luca, M.; et al. Practical management plan for invasive mosquito species in Europe: I. Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*). *Travel Med. Infect. Dis.* **2020**, *35*, 101691. [[CrossRef](#)]
40. Kythreoti, G.; Sdralia, N.; Tsitoura, P.; Papachristos, D.P.; Michaelakis, A.; Karras, V.; Ruel, D.M.; Yakir, E.; Bohbot, J.D.; Schulz, S.; et al. Volatile allosteric antagonists of mosquito odorant receptors inhibit human-host attraction. *J. Biol. Chem.* **2021**, *296*, 100172. [[CrossRef](#)]
41. Ioannou, C.S.; Hadjichristodoulou, C.; Kyritsi, M.A.; Papadopoulos, N.T. 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* **2021**, *12*, 527. [[CrossRef](#)]
42. Ioannou, C.S.; Hadjichristodoulou, C.; Mouchtouri, V.A.; Papadopoulos, N.T. Effects of selection to Diflubenzuron and *Bacillus thuringiensis* Var. *Israelensis* on the overwintering successes of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Insects* **2021**, *12*, 822. [[PubMed](#)]
43. Medici, A.; Carrieri, M.; Scholte, E.J.; Maccagnani, B.; Dindo, M.L.; Bellini, R. Studies on *Aedes albopictus* larval mass-rearing optimization. *J. Econ. Entomol.* **2011**, *104*, 266–273. [[CrossRef](#)]
44. Balestrino, F.; Medici, A.; Candini, G.; Carrieri, M.; McCagnani, B.; Calvitti, M.; Maini, S.; Bellini, R. γ Ray dosimetry and mating capacity studies in the laboratory on *Aedes albopictus* males. *J. Med. Entomol.* **2010**, *47*, 581–591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Becker, N.; Petric, D.; Zgomba, M.; Boase, C.; Madon, M.; Dahl, C.; Kaiser, A. *Mosquitoes and Their Control*; Springer Science & Business Media: Berlin/Heidelberg, Germany, 2010.
46. Moorefield, H.H. Sexual dimorphism in mosquito pupae. *Mosq. News* **1951**, *11*, 175–177.
47. Vargas, M. Sexual dimorphism of larvae and pupae of *Aedes aegypti* (Linn.). *Mosq. News* **1968**, *28*, 374–379.
48. Abbott, W.S. A Method of computing the effectiveness of an insecticide. 1925. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **1987**, *3*, 302–303. [[PubMed](#)]
49. World Health Organization. *Guidance Framework for Testing the Sterile Insect Technique as a Vector Control Tool against Aedes-Borne Diseases*; WHO: Geneva, Switzerland, 2020.
50. Dumont, Y.; Yatát-Djeumen, I.V. Sterile insect technique with accidental releases of sterile females. *Impact on mosquito-borne diseases control when viruses are circulating. Math. Biosci.* **2022**, *343*, 108724.
51. Ross, P.A.; Endersby-Harshman, N.M.; Hoffmann, A.A. A Comprehensive assessment of inbreeding and laboratory adaptation in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Evol. Appl.* **2019**, *12*, 572–586. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Yeap, H.L.; Endersby, N.M.; Johnson, P.H.; Ritchie, S.A.; Hoffmann, A.A. Body size and wing shape measurements as quality indicators of *Aedes aegypti* mosquitoes destined for field release. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2013**, *89*, 78–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

53. Jong, Z.-W.; Faeza, N.; Kassim, A.; Aiman Naziri, M.; Webb, C.E. The Effect of inbreeding and larval feeding regime on immature development of *Aedes albopictus*. *J. Vector Ecol.* **2016**, *42*, 105–112. [[CrossRef](#)]
54. Richardson, A.J.; Williams, C.R. Inter-population mating success in Australian Dengue vector mosquitoes: Effects of laboratory colonization and implications for the spread of transgenics. *J. Vector Ecol.* **2013**, *38*, 111–119. [[CrossRef](#)]
55. Li, Y.; Zhang, M.; Wang, X.; Zheng, X.; Hu, Z.; Xi, Z. Quality control of long-term mass-reared *Aedes albopictus* for population suppression. *J. Pest Sci.* **2021**, *94*, 1531–1542. [[CrossRef](#)]
56. Chung, H.N.; Rodriguez, S.D.; Gonzales, K.K.; Vulcan, J.; Cordova, J.J.; Mitra, S.; Adams, C.G.; Moses-Gonzales, N.; Tam, N.; Cluck, J.W.; et al. Toward Implementation of Mosquito Sterile Insect Technique: The effect of storage conditions on survival of male *Aedes aegypti* mosquitoes (Diptera: Culicidae) during transport. *J. Insect Sci.* **2018**, *18*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Bellini, R. Safety, regulatory and environmental issues with SIT-based mosquito vector control in European countries. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **2022**, *in press*.
58. Collins, C.M.; Michaelakis, A. Managing stakeholder concerns associated with releases of imported stock in insect control programmes. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **2022**, *in press*.
59. Culbert, N.J.; Kaiser, M.; Venter, N.; Vreysen, M.J.B.; Gilles, J.R.L.; Bouyer, J. A Standardised method of marking male mosquitoes with fluorescent dust. *Parasites Vectors* **2020**, *13*, 1–11. [[CrossRef](#)]
60. Cator, L.J.; Wyer, C.A.S.; Harrington, L.C. Mosquito sexual selection and reproductive control programs. *Trends Parasitol.* **2021**, *37*, 330–339. [[CrossRef](#)]
61. Oliva, C.F.; Damiens, D.; Vreysen, M.J.B.; Lemperière, G.; Gilles, J. Reproductive strategies of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and implications for the Sterile Insect Technique. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e78884. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Parker, A.G.; Vreysen, M.J.B.; Bouyer, J.; Calkins, C.O. Sterile insect quality control/assurance. In *Sterile Insect Technique*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2020; pp. 399–440.
63. Bellini, R.; Balestrino, F.; Medici, A.; Gentile, G.; Veronesi, R.; Carrieri, M. Mating Competitiveness of *Aedes Albopictus* Radio-Sterilized Males in Large Enclosures Exposed to Natural Conditions. *J. Med. Entomol.* **2013**, *50*, 94–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Bellini, R.; Carrieri, M.; Balestrino, F.; Puggioli, A.; Malfacini, M.; Bouyer, J. Field competitiveness of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) irradiated males in pilot Sterile Insect Technique trials in northern Italy. *J. Med. Entomol.* **2021**, *58*, 807–813. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]