



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ  
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ  
Департман за Фитомедицину  
и заштиту животне средине



**УТИЦАЈ УСЛОВА МАСОВНОГ УЗГОЈА НА  
СЕЛЕКЦИЈУ ДУЖИНЕ КРИЛА КОМАРАЦА  
ВРСТЕ *Stegomyia albopicta* (Diptera: Culicidae) И  
ЕФЕКТИ МЕТОДЕ ОТПУШТАЊА  
СТЕРИЛНИХ МУЖЈАКА**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментори:

Проф. др Душан Петрић

Проф. др Romeo Bellini

Кандидат:

М.Sc. Дубравка Пудар

Нови Сад, 2018.

---

**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ**  
**ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**

**КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА**

Редни број: РБР	
Идентификациони број: ИБР	
Тип документације: ТД	Монографска документација
Тип записа: ТЗ	Текстуални штампани материјал
Врста рада (дипл., маг., докт.): ВР	Докторска дисертација
Име и презиме аутора: АУ	М.Сс. Дубравка Пудар
Ментор (титула, име, презиме, звање): МН	др Душан Петрић, редовни професор др Romeo Bellini, редовни професор
Наслов рада: НР	Утицај услова масовног узгоја на селекцију дужине крила комараца врсте <i>Stegomyia albopicta</i> (Diptera: Culicidae) и ефекти методе отпуштања стерилних мушкараца
Језик публикације: ЈП	српски
Језик извода: ЈИ	срп. / енг.
Земља публикација: ЗП	Република Србија
Уже географско подручје: УГП	АП Војводина
Година: ГО	2018
Издавач: ИЗ	ауторски репринт
Место и адреса: МА	21000 Нови Сад, Трг Доситеја Обрадовића 8
Физички опис рада: ФО	8 поглавља / 207 страница / 138 слика / 9 графикона / 20 табела / 323 референце / биографија и захвалница
Научна област: НО	Биотехничке науке

Научна дисциплина: НД	Ентомологија
Предметна одредница, кључне речи: ПО	Техника стерилизације инсеката, <i>Aedes albopictus</i> [ <i>Stegomyia albopicta</i> ]
УДК	597.771:533.693(043.3)
Чува се: ЧУ	Библиотека Пољопривредног факултета, Универзитета у Новом Саду
Важна напомена: ВН	нема
<p>Извод: ИЗ</p> <p><i>Aedes albopictus</i> [<i>Stegomyia albopicta</i>] (Skuse 1895) (Diptera: Culicidae) је тренутно најекспанзивнија инвазивна врста комараца на свету. Ова врста је од изузетног медицинског значаја, пошто су женке вектори преко 20 арбовируса (проузроковача денге, чикунгуња грознице, различитих енцефалитиса и др.) и нематода рода <i>Dirofilaria</i>. Интродуковање врсте <i>Ae. albopictus</i> у Србију је први пут забележено 2009. год. и још увек је локализована на граничним прелазима са Хрватском и Црном Гором. Услед изложености опасности од продора ове врсте у Србију и могуће интродукције болести чији се проузроковачи преносе овим вектором, наша земља се укључује у истраживања о техници стерилизације инсеката (Sterile Insect Technique - SIT), са намером да се SIT интегрише у стратегије које могу спречити насељавање <i>Ae. albopictus</i>.</p> <p>Истраживања у циљу побољшања продуктивности масовног узгоја, као и квалитета масовно узгојених мужјака, су од фундаменталног значаја за успех SIT-а. Ова студија је, у свом првом делу, била фокусирана на поређење утицаја три различите величине кавеза за масовни узгој <i>Ae. albopictus</i>, на дужину крила, преживљавање адулта и продукцију јаја, током 20 генерација колонизације; и одређивање оптималне величине кавеза за стандардни масовни узгој. Дужина крила је одабрана као значајна морфолошка промењива, која је повезана са виталношћу гајених комараца кроз општу величину тела. За мерење дужине крила (по линеарном методу), као и за бројање јаја, коришћен је компјутерски програм за обраду и анализу слике (ImageJ). Колонија <i>Ae. albopictus</i> коришћена у овом експерименту, потекла је од јаја сакупљених у природи и одржавана је у комори са контролисаним климатским условима у лабораторији Centro Agricoltura Ambiente (CAA) „Gioglio Nicoli“, Crevalcore, Италија. У кавезе од плексигласа 40 x 40 x 40 cm (C1), 100 x 20 x 100 cm (C2) и 100 x 65 x 100 cm (C3) интродукована је једнака густина адулта (20 адулта/литри), док је однос полова био 1:1. Током целог огледа је укупно процесуирано око 365.600,00 комараца.</p> <p>Сви тестирани параметри испољили су сличну динамику опадања својих вредности приближно до средине колонизационог периода, да би затим уследио пораст. Опоравак популације комараца у другом постпериоду је био много израженији у кавезима C1 и C2, него у кавезу C3. Узгој комараца у кавезу C1 испољио је најнижи негативан утицај на оригиналне карактеристике популације комараца.</p> <p>Пре примене SIT-а у циљу сузбијања природне популације комараца, неопходно је оцртати квалитет масовно узгојених инсеката, компетитивност лабораторијски узгојених стерилисаних мужјака у односу на фертилне мужјаке из дивље популације (у процесу парења са женкама), као и њихову способност да индукују стерилитет у циљној популацији. У складу са тим, други део ове студије је био фокусиран на оцену релевантних параметара у полу-природним условима. У ове сврхе коришћена су 4 велика кавеза (тзв. тунела) димензија 8 x 5 x 2,8 m, постављена у вегетацију у приградској области Болоње (CAA), како би се што боље симулирали природни услови. Однос стерилисаних мужјака: фертильних мужјака: неспарених женки (<i>virgo intacta</i>) био је константан</p>	

(100:100:100), а примењена доза ирадијације 30 Gy. Коришћена су три различита соја *Ae. albopictus*: два лабораторијска и један дивљи. У третману су испитиване 4 различите комбинације сојева (у укупно 15 понављања) базиране на два испитивана соја; док је у контроли (100 фертилних мужјака:100 неспарених женки) коришћен само један лабораторијски сој (у 4 понављања). Током трајања целог експеримента укупно је за интродукцију у тунеле издвојено 5300 *Ae. albopictus* (3400 мужјака и 1900 женки).

Резидуални фертилитет мужјака (у просеку: 2,82 % на 30 Gy ), као и уочене вредности CIS и Fried индекса (у просеку свака око 1), били су веома задовољавајући, указујући да су стерилни и фертилни мужјаци били приближно једнако компетитивни, и да је доза ирадијације од 30 Gy била веома добар избор за стерилисање мужјака (оптимизација баланса између виталности мужјака и нивоа стерилитета). Додатно је праћено још неколико важних индикатора квалитета испитиваних сојева: почетни морталитет мужјака, дневна стопа преживљавања, реаговање на утицај метеоролошких фактора, и проценат женки преосталих после раздвајања полова. Сви испитивани сојеви су се одликовали добрим вредностима одабраних индикатора квалитета.

Датум прихватања теме од стране Сената: ДП	05.03.2015.
Датум одбране: ДО	
Чланови комисије: (име и презиме / титула / звање / назив организације / статус) КО	<hr/> <p>др Душан Петрић, редовни професор за ужу научну област Ентомологија, Пољопривредни факултет, Нови Сад, Департман за Фитомедицину и заштиту животне средине; ментор</p> <hr/> <p>др Romeo Bellini, редовни професор за ужу научну област Ентомологија, Department of Medical and Veterinary Entomology, Centro Agricoltura Ambiente “G. Nicoli” (CAA), IAEA Collaborating Centre SUSTENIA S.r.l. Crevalcore, Italy; ментор</p> <hr/> <p>др Марија Згомба, редовни професор за ужу научну област Фитофармација, Пољопривредни факултет, Нови Сад, Департман за Фитомедицину и заштиту животне средине; председник</p>

**UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF AGRICULTURE**

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Dubravka Pudar, M.Sc.
Mentor: MN	Dušan Petrić, PhD, full professor Romeo Bellini PhD, full professor
Title: TI	Effect of mass production on the wing size selection of <i>Stegomyia albopicta</i> (Diptera: Culicidae) and evaluation of sterile male release efficiency
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	English / Serbian
Country of publication: CP	The Republic of Serbia
Locality of publication: LP	The Province of Vojvodina
Publication year: PY	2018
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Sq. Dositej Obradović 8
Physical description: PD	8 chapters / 207 pages / 138 images / 9 graphs / 20 tables / 323 references / biography and acknowledgment
Scientific field SF	Biotechnical sciences

Scientific discipline SD	Entomology
Subject, Key words SKW	Sterile Insect Technique, <i>Aedes albopictus</i> [ <i>Stegomyia albopicta</i> ]
UDC	597.771:533.693(043.3)
Holding data: HD	Library of the Faculty of Agriculture, University of Novi Sad
Note: N	None
Abstract: AB	

Currently, the most expansive invasive mosquito species in the world is *Aedes albopictus* [*Stegomyia albopicta*] (Skuse 1895) (Diptera: Culicidae). This species is of paramount medical importance, as females are efficient vectors of more than 20 viral pathogens (including dengue, chikungunya, different encephalitis viruses etc.) as well as nematodes of genus *Dirofilaria*. Introduction of *Ae. albopictus* in Serbia has been reported for the first time in 2009, and it is still restricted to the border crossings with Croatia and Montenegro. Due to the elevated risk of *Ae. albopictus* spreading and establishing across Serbia and possible introduction of vector borne diseases, our country is getting involved in the research of Sterile Insect Technique (SIT), with intention to integrate SIT into strategies that can prevent *Ae. albopictus* detrimental vectorial consequences in our region.

Research to improve the productivity of mass-rearing, as well as the quality of mass reared males is of essential importance for the success of SIT strategy. This study, in its first part, compared the influence of three differently sized cages for *Ae. albopictus* mass rearing on wing length, adult survival and egg production during 20 generations of reared mosquitoes, and determined the optimal cage size for standard mass rearing. The wing length was selected as an easy to measure morphological variable well correlated with fitness of reared mosquitoes. An open source image processing and analysis programme (ImageJ) was used for the wing measurement (by linear method), as well as for egg counting. *Aedes albopictus* strain used for this experiment was derived from wild collected eggs and maintained in a climate-controlled room in the laboratory of Centro Agricoltura Ambiente (CAA) „Gioglio Nicoli“, Crevalcore, Italy. Plexiglas cages of 40 x 40 x 40 cm (C1), 100 x 20 x 100 cm (C2) and 100 x 65 x 100 cm (C3) were loaded with equal adult density (20 adults// litre), and sex ratio of 1:1. During the entire experiment, a total of 365,600.00 mosquitoes were processed.

All tested parameters demonstrated similar dynamic of decrease to mid colonization time and increase latter on. Recovering of mosquito population in second sub period was particularly evident in cages C1 and C2, then in C3. Mosquito rearing in cage C1 provided the least negative impact on original characteristics of the native mosquito population.

Prior to SIT application, with an aim to control wild mosquito population, it is necessary to assess quality of mass reared insects i.e. the competitiveness (for mating with females) of irradiated mass-reared males in respect to fertile males from wild population as well as their capacity to induce sterility into the target population. Accordingly, the second part of this study was focused on relevant parameters assessment in semi-field conditions. For these purposes 4 large proof net-screened enclosures (sized 8 x 5 x 2.8 m) were set in suburban vegetated area in Bologna province (CAA) ensuring conditions which closely simulate the field. The ratio of sterile males:fertile males: virgin females was constant (100:100:100), and administered dose of irradiation was 30 Gy. Three different *Ae. albopictus* strains were used (two laboratory and one wild). Four different strain combinations (in total of 15 replicates) were tested in

treatment (involving two strains); while in reference enclosures only one (laboratory) strain with 100 fertile males:100 virgin females (4 replicates) was tested . During the whole experiment a total of 5300 *Ae. albopictus* (3400 males and 1900 females) was employed.

Recorded male residual fertility (mean 2.82% at 30 Gy), as well as observed CIS and Fried indexes values (both indexes in range of 1) were very satisfying, indicating that sterile males were approximately equally competitive with fertile ones and that 30 Gy irradiation dose was very good choice (in terms of optimized balance between male fitness and sterility level). Several other important strain quality indicators were additionally monitored: initial male mortality, survival rate, response to meteorological factors, and percentage of residual females in the sexed sample. All parameters tested showed good performance for all three strains.

Accepted on Senate on: AS	05.03.2015.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<hr/> <p>Dušan Petrić PhD, full professor, scientific field Entomology, Department of Environmental and Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad; mentor</p> <hr/> <p>Romeo Bellini PhD, full professor, scientific field Entomology, Department of Medical and Veterinary Entomology, Centro Agricoltura Ambiente “G. Nicoli” (CAA), IAEA Collaborating Centre SUSTENIA S.r.l.Crevalcore, Italy; mentor</p> <hr/> <p>Marija Zgomba PhD, full professor, scientific field Phytopharmacy, Department of Environmental and Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad; president</p>

# САДРЖАЈ

<b>1. УВОД</b> .....	1
<b>2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ</b> .....	6
2.1. Особине врсте <i>Aedes albopictus</i> [ <i>Stegomyia albopicta</i> ].....	6
2.2. Техника стерилизације инсеката – SIT (Sterile Insect Technique).....	17
2.3. Историјат и примена SIT-а у контроли различитих инсекатских врста.....	18
2.4. Историјат примене SIT-а у сузбијању комараца .....	22
2.5. Савремени приступи у генетичкој контроли комараца.....	24
2.5.1. Уношење доминантног леталног гена у популације вектора (RIDL принцип).....	25
2.5.2. Генетски модификовани комарци.....	28
2.5.3. Употреба бактерије <i>Wolbachia pipientis</i> .....	28
2.5.4. Савремена примена класичног SIT принципа у сузбијању комараца.....	31
2.6. Могуће последице отпуштања <i>Wolbachia</i> инфицираних и генетички модификованих комараца.....	33
2.7. Оптимизација класичне SIT технике .....	34
2.7.1. Масовни узгој.....	35
2.7.2. Контрола квалитета .....	39
2.7.3. Начини сепарације полова.....	39
2.7.4. Стерилизација .....	43
2.7.5. Последице стерилизације на мужјаке и њихову ефикасност.....	48
2.7.6. Мерење стерилитета у дивљој популацији .....	51
2.7.7. Компетитивност и Fried’s Competitiveness Index.....	52
2.7.8. Отпуштање стерилисаних мужјака у природу .....	55
2.7.9. Начини евалуације програма и развој маркера за мониторинг отпуштених комараца .....	70
<b>3. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА И РАДНА ХИПОТЕЗА</b> .....	72



<b>4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА</b> .....	74
4.1. Оглед I Испитивање услова масовног узгоја .....	74
4.1.1. Колонија комараца и методе узгоја.....	74
4.1.2. Опис кавеза и примењених операција.....	74
4.1.3. Мерење дужине крила, оцена стопе преживљавања и продукција јаја.....	78
4.1.4. Статистичка обрада добијених резултата .....	80
4.2. Оглед II Испитивање учинка стерилисаних мужјака .....	82
4.2.1. Колонија комараца .....	82
4.2.2. Експериментални тунели, комбинације сојева и периоди тестирања.....	82
4.2.3. Узгој комараца .....	86
4.2.4. Раздвајање полова у стадијуму лутке .....	90
4.2.5. Процедура ирадијације лутки мужјака .....	93
4.2.6. Операције у тунелима.....	95
4.2.7. Одређивање броја јаја по тунелу, фекондитет женки и стопа фертилитета јаја .....	103
4.2.8. Резидуални фертилитет .....	105
4.2.9. CIS и Fried индекси .....	105
4.2.10. Метеоролошки фактори.....	106
4.2.11. Дневна стопа преживљавања .....	107
4.2.12. Статистичка обрада добијених резултата .....	108
<b>5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА</b> .....	110
5.1. Оглед I Испитивање услова масовног узгоја .....	110
5.1.1. Дужина крила .....	110
5.1.2. Преживљавање адулта.....	113
5.1.3. Продукција јаја.....	117
5.1.4. Паралелизам .....	119
5.1.5. Корелације.....	119
5.2. Оглед II Испитивање учинка стерилисаних мужјака .....	120
5.2.1. Почетни морталитет мужјака .....	120
5.2.2. Почетни морталитет женки .....	129

5.2.3. Број крвљу нахрањених женки по тунелу; број јаја по тунелу; фекондитет; фертилитет; CIS и Fried индекси.....	129
5.2.4. Утицај метеоролошких фактора .....	135
5.2.5. Бројност резидуалних женки у узорку .....	144
<b>6. ДИСКУСИЈА</b> .....	<b>146</b>
6.1. Оглед I Испитивање услова масовног узгоја .....	146
6.2. Оглед II Испитивање учинка стерилисаних мужјака .....	150
6.2.1. Почетни морталитет мужјака .....	151
6.2.2. Почетни морталитет женки, стопа исхране крвљу, спремност комараца за репродукцију .....	154
6.2.3. Број јаја по тунелу, фекондитет и фертилитет, капацитет за индуковање стерилитета (CIS Index) и компетитивност мужјака (Fried's Competitiveness Index).....	157
6.2.4. Просечна дневна стопа преживљавања и њене корелације са метеоролошким факторима .....	162
6.2.5. Корелације температурних параметара и укупног почетног морталитета фертилних мужјака .....	165
6.2.6. Процент резидуалних женки у узорку и остала питања сепарације полова.....	169
6.2.7. Потребна будућа истраживања и предлог стратегије за поједностављење процедура процене квалитета мужјака и његовог мониторинга током сезоне.....	173
<b>7. ЗАКЉУЧЦИ</b> .....	<b>176</b>
<b>8. ЛИТЕРАТУРА</b> .....	<b>181</b>
<b>БИОГРАФИЈА</b> .....	<b>208</b>

# 1. УВОД

*Aedes albopictus* [*Stegomyia albopicta*] (Skuse 1895) (Diptera: Culicidae) је тренутно најекспанзивнија инвазивна врста комараца на свету (Benedict et al. 2007). Пореклом је из тропских шума југоисточне Азије (народни назив је азијски тиграсти комарац) и током последње три деценије се глобално раширила (ECDC 2009) на све континенте изузев Антарктика (Benedict et al. 2007, Enserink 2008). У Европи је присутна од 1979. године, када је први пут констатована у Албанији (Adhami and Murati 1987) и до сада је забележена у преко 20 држава, од којих се у многима населила и раширила. Интродуковање врсте *Ae. albopictus* у Србију, које је први пут забележено 2009. године на граници са Хрватском (Батровци) и успешно елиминисано исте године (Petrić 2009), да би потом, било констатовано и сваке наредне године на истом локалитету (Petrić et al. 2012, ECDC 2018); док је почев од 2013. године ова врста редовно налажена и на граничном прелазу са Црном Гором (Гостун) (ECDC 2018).

Инвазија *Ae. albopictus* на нова подручја је најчешће омогућена путем пасивног транспорта јаја (отпорних на хладноћу и сушу) у половним гумама или у посудама са резницама бамбуса и цвећа - током међународне трговине (ECDC 2009), као и путем различитих транспортних средстава за превоз путника и робе (аутомобилима, аутобусима, камионима, трајектима, чамцима, јахтама) (Petrić et al. 2006, 2009), у којима су одрасли комарци „слепи путници“. У прилог претходно наведеној чињеници иде дугогодишње налажење *Ae. albopictus* управо на граничним прелазима Србије и земаља у којима је настањен (Хрватска, Црна Гора), где због граничне и царинске контроле путници отварају прозоре и врата на превозним средствима, чиме се „слепим путница“ пружа могућност бега.

*Aedes albopictus* је од великог медицинског значаја, пошто су женке вектори преко 20 арбовируса (проузроковача денге, чикунгуња грознице, различитих енцефалитиса и др.), као и нематода рода *Dirofilaria* (које нпр. изазивају тзв. болест „црва срца“ код паса, али могу инфицирати и људе) (Gratz 2004, Paupy et al. 2009, Zhong et al. 2013). Недавна појава

чикунгуње и денге на Хавајима, Маурицијусу, Габону, Мадагаскару и Ријунион острву (Rezza 2012), као и њихов први аутохтони пренос у Европи: чикунгуње у Италији 2007. год. и денге у Француској и Хрватској 2010. год. (Rezza et al. 2007, WHO/EMSA 2011) за шта је био одговоран *Ae. albopictus*, додатно потврђују све већи значај ове врсте у јавном здрављу широм света (Zhong et al. 2013). Осим тога, женке ове врсте боду дању и веома су агресивне, те онемогућавају нормалне активности људи на отвореном.

Услед изложености опасности од продора ове врсте у Србију и могуће интродукције болести чији се проузроковачи преносе овим вектором, развој нових стратегија које би употпуниле постојеће мере сузбијања вектора постаје имепратив на нивоу државе. За правовремени одговор на могуће инвазије и епидемије, потребна је интеграција свих расположивих мера борбе (физичких, биолошких, хемијских и генетичких) које могу спречити насељавање *Ae. albopictus* у наш регион. С обзиром на све неведено, наша земља се укључује у истраживања о техници стерилизације инсеката (Sterile Insect Technique - SIT) са циљем да научимо више о овом начину сузбијања комараца и његовој примени. Пројекат развоја SIT програма за сузбијање *Ae. albopictus* у Италији је почео још 1999. год. (Bellini et al. 2007, 2010, 2013a,b) и обезбеђује нам драгоцен увид у досадашња постигнућа и приоритете оптимизације и стандардизације овог приступа, све у циљу побољшања квалитета примене овог програма. Управо у сарадњи са поменутом истраживачком групом и у њиховој лабораторији Centro Agricoltura Ambiente “Giorgio Nicoli” (CAA), Crevalcore, Италија, изведени су експерименти који ће бити приказани у оквиру ове докторске дисертације.

Техника стерилизације инсеката је генетички базиран метод контроле штеточина пољопривредних култура, као и инсеката од медицинског/ветеринарског значаја, коришћењем масовног отпуштања стерилисаних инсеката у природу, са циљем смањења фертилитета (броја испиљених јединки) дивље популације исте врсте. Он је, заправо, облик „контроле рађања“ стављен у функцију смањења бројности популације инсеката штеточина, паразита и молестаната. Најчешће се у природу отпуштају мужјаци стерилисани гама зрацима, који се затим такмиче са дивљим мужјацима око женки своје врсте, у процесу парења. Ако дође до копулације дивље женке и стерилног мужјака – изостаје потомство, те се смањује бројност наредне генерације (Dyck et al. 2005). Овај

метод је примењив само код инсеката који се размножавају гамогенетски (тј. код којих долази до копулације).

SIT је до сада рађен на великом броју врста штеточина: воћним мувама (Diptera: Tephritidae) на којима се тренутно најшире примењује, це-це муви *Glossina* spp (Diptera: Glossinidae), муви врсте *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), смотавцима (Lepidoptera: Tortricidae), као и код неких представника реда Coleoptera. У последње време је поново оживело интересовање за примену ове технике у борби против комараца (Diptera: Culicidae: *Anopheles* spp., *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus*) (Dyck et al. 2005). Тренутно се ова техника примењује на шест континената, и има четири стратешке опције: сузбијање, ерадикацију спречавање ширења и превенцију интродуковања и/или настањивања (IAEA 2016).

SIT програм се састоји из две основне фазе: 1. масовног узгоја инсеката у специјално опремљеним постројењима и 2. стерилизације мужјака и њиховог отпуштања у природу (Dyck et al. 2005).

Први и неопходан корак пре извођења отпуштања стерилисаних мужјака у природу је оцењивање параметара њихове виталности у лабораторијским условима (Massonnet-Bruneel et al. 2013). Истраживања о побољшању продуктивности масовног узгоја и квалитета масовно узгојених мужјака су од пресудног значаја за успех SIT технике (Benedict et al. 2009).

Утврђено је да вештачки услови гајења значајно утичу на виталност инсекта кроз процесе селекције (Nunny 2002, Whitlock 2002, Reed and Frankham 2003), што може водити фенотипским и генотипским променама у колонији (Bartlett 1984). Овај феномен адаптације се дешава убрзо након колонизације (њен је пратећи елемент) са евидентним утицајем на неколико генерација (Latter and Mulley 1995, Montgomery et al. 2000, Woodworth et al. 2002), и може снажно смањити ефикасност стерилисанх мужјака након отпуштања у природу (услед негативног утицаја на њихов квалитет) (Nunny 2002).

За праћење промена до којих може доћи током масовног узгоја инсеката, већина узгајалишта примењује тестове контроле квалитета (van Lenteren et al. 2003, Madakacherry et al. 2014) који су есенцијални за одржавање квалитета адулта, ефикасност узгоја, оптимизацију рада и трошкова (Carvalho et al. 2014). Они подразумевају честа мерења тежине лутки, способности парења и летења, дуговечности адулта, односа полова

(одступање од „нормалног“ односа полова у колонији може бити рани показатељ проблема у узгоју), стопе и времена пиљења, стерилитета (FAO/IAEA/USDA 2003).

Квалитет колоније такође може бити оцењен путем процене њене виталности успеха јединке да пренесе своје гене у наредну генерацију (Massonnet-Brunel et al. 2013). Две основне компоненте виталности су преживљавање и репродукција, које могу бити оцењене путем фекондитета, фертилитета, величине ларви, дужине развоја, стопе излетања адулта, преживљавања ларви/адулта, удела мужјака у колонији и степена њихове конкуритивности током парења. Осим тога, проналажење најбољих показатеља виталности (нпр. величине тела, дужине крила или дуговечности) је веома корисно за одабир колонија са најбољим особинама (Marelli et al. 2006).

Демонстрирано је да је успех при парењу дињине муве *Bactocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) под утицајем способности летања масовно узгојених мужјака, јер може доћи до ограничавања њихове дисперзије, као и до одступања од карактеристичне фреквенције вибрација крила током „удварања“ мужјака (Nunnu 2002.). Дужина крила је одабрана као значајна морфолошка променљива која је повезана са виталношћу кроз општу величину тела, и то не само код кућне муве *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) (Bryant et al. 1986, 1999), него и код комараца (Ward 1963, Kelly and Edman 1992, Menge et al. 2005). Као једна од карактеристика виталности, величина комарца може утицати на преживљавање, а такође је и у позитивној корелацији са фекондитетом (Kelly and Edman 1992, Menge et al. 2005).

Квалитет лабораторијски узгајаних стерилисаних мужјака на крају бива оцењен њиховом конкуритивном способношћу (након отпуштања у природу) у процесу такмичења са дивљим мужјацима за парење са дивљим женкама (Harris et al. 2011, 2012) успех SIT програма зависи од учинка инсекта отпуштеног у природу и његових особина.

Лабораторијски протоколи за мерење конкуритивности нису најадекватнији и често могу довести до грешака. Једина релевантна мера конкуритивности стерилисаних мужјака комараца је испитивање успеха у такмичењу са мужјацима из дивље популације у природним условима. Али, због тежине и обима извођења оваквих компарација, добри резултати се могу постићи и употребом система великих кавеза, испитивањима у полу-природним условима (Knols et al. 2002, Helinski et al. 2008, Robinson et al. 2009). Путем

прикупљања података односа бројности стерилних и фертилних мужјака и нивоа стерилитета дивљих женки, може се доћи до прецизне оцене конкуритивности мужјака. Ово омогућава идентификацију учинка стерилних мужјака и пружа основ за евентуалну модификацију ставки протокола које имају највећи утицај на конкуритивност стерилисаних мужјака (у складу са евентуалним променама у масовном узгоју, транспорту или начину отпуштања) (Robinson et al. 2009).

Истраживање које ће бити представљено у овој дисертацији је у првом делу (Оглед I) фокусирано на поређење утицаја различитих величина кавеза за масовни узгој *Ae. albopictus* на: дужину крила, преживљавање адулта и продукцију јаја током 20 генерација колонизације. У следећем кораку је препоручена оптимална величина кавеза за стандардизацију масовног узгоја у циљу минимизације селекције оних особина које би могле редуковати ефикасност масовног узгоја и SIT апликације у природним условима. На крају је тестирана ефикасност отпуштања стерилисаних мужјака у полу-природним условима њихова потенцијална способност да индукују стерилитет у дивљу популацију комараца (Оглед II). Такође су прикупљене драгоцене информације о квалитету трију испитиваних сојева *Ae. albopictus*.

Осим тога, у оквиру ове дисертације је приказан детаљан преглед досадашњих сазнања у вези са применом SIT-а на комарцима, почев од његовог историјата до употребе најсавремених технологија данашњице (укључујући и трансгенетички приступ), са мноштвом примера из праксе, објашњењима примене различитих техника у комбинацији са класичним SIT методом, као и критичким освртом на њихове карактеристике. Овај преглед би могао послужити као корисна литература научним радницима и техничком особљу, пре него што дође до примене SIT метода у Србији.

## 2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

### 2.1. Особине врсте *Aedes albopictus* [*Stegomyia albopicta*]

#### Станиште

Биологија *Aedes albopictus* је веома прилагодљива условима средине. Ова врста се развија у рецепијентима воде природног и вештачког порекла и адаптирала се на широки спектар животних услова. Може се наћи у најразличитијим стаништима ларви (Hawey 1988; Miller and Ballinger 1988 цитирано у Ayres et al. 2002; Cane 2007) и има способност да колонизује нова подручја. Показало се да *Ae. albopictus* има различите, специјализоване популације толерантне на хладноћу, као и на тропске услове (Knudsen 1995; Cane 2007).

*Aedes albopictus* се налази у урбаном, руралном и шумском окружењу, у тропским, суптропским и умереним климатским подручјима. Ова врста може бити веома ретка или у потпуности одсутна у густо насељеним урбаним подручјима, у којима нема вегетације и одговарајућих станишта ларви, као и у руралним регионима где је вегетација уклоњена (Rudnick and Hammon 1960; Cane 2007). *Aedes albopictus* може да се развија у рецепијентима воде широког спектра величина и материјала. Овој врсти највише погодује кишница, те се може наћи у вештачким рецепијентима воде нпр. у коришћеним гумама (Сл. 1), флашама, вазама, саксијама, пластичним чашама, одбаченим конзервама са кишницом (Сл. 2), мешалицама за бетон, запуштеним олуцима (Сл. 3), у шахтовима и одводима за кишницу (Сл. 4). Када су у питању природни рецепијенти воде, то могу бити: рупе у дрвећу (Сл. 5), љуске кокоса, пањеви бамбуса (Сл. 6), фитотелмате (група биљака које имају могућност акумулирања и чувања воде у делу биљног тела) (Сл. 7), отвори у камењу (Сл. 8) и сл. (Nathan and Knudsen 1994; Cane 2007).





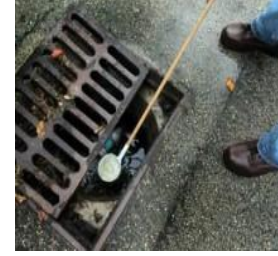
Сл.1 Половна гума



Сл. 2 Бачена тегла



Сл. 3 Запуштен олук



Сл.4 Шахт

(Извор за Сл. 1: <http://naturalunseenhazards.files.wordpress.com>) (Сл. 2: <http://www.cdc.gov>)

(Извор за Сл. 3: <http://entomology.cornell.edu>) (Извор за Сл. 4: <http://cdn2-b.examiner.com>)



Сл. 5 Рупа у дрвету



Сл. 6 Пањ бамбуса



Сл. 7 *Nepenthes rajah*



Сл. 8 Отвор у камену

фитотелмата

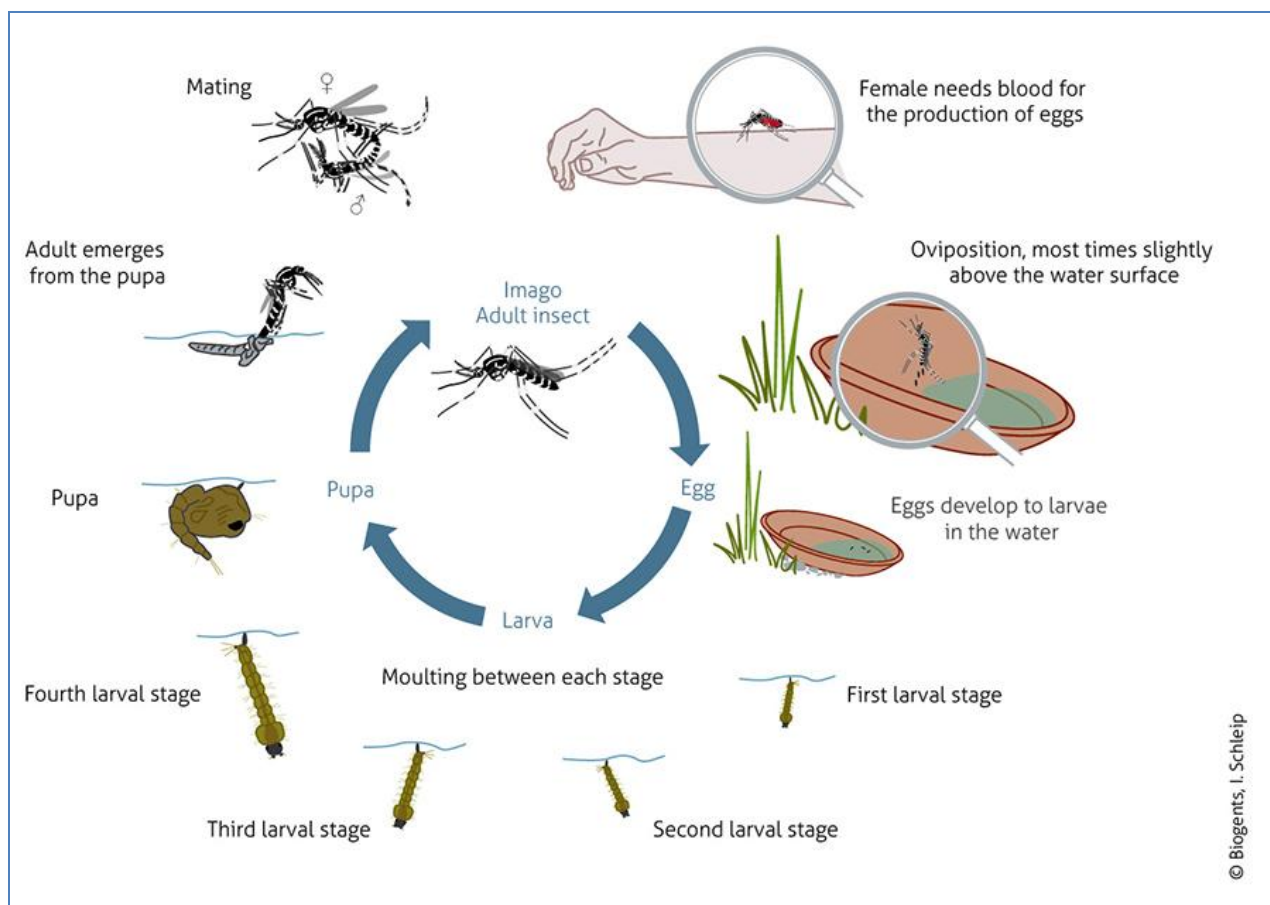
(Извор за Сл. 5 <http://www.microscopy-uk.org>) (Сл. 6: <http://robwalkerpoet.blogspot.com>)

(Извор за Сл. 7: <http://en.wikipedia.org>) (Извор за Сл. 8: <http://makayan.com>)

### Циклус развоја и морфологија

*Aedes albopictus* је мултиволтна врста, са више генерација годишње (Hawley 1988; Cane 2007). У неким тропским подручјима, са довољном количином падавина, развој генерације траје 3 недеље, што резултује појавом чак 17 генерација годишње. У хладнијим регионима, период развоја може трајати до 8 недеља, тако да је годишњи број генерација од 5-7 (Hawley 1988; Cane 2007).

Циклус развоја ове врсте, као и код осталих комараца, обухвата четири развојна стадијума: јаје, ларва, лутка и имаго ( адулт или одрасла јединка) (Сл. 9). Развој преадултних (јувенилних) стадијума је везан за акватична станишта.



Сл. 9 Животни циклус врсте *Aedes albopictus*

(Извор: <http://www.biogents.com>)

**Јаја** *Ae. albopictus* су издужено-овалног облика, дужине око 0,5 mm. Тек положена јаја су мека, нежна и беле боје, али касније постају црна и чврста (Сл. 10). Положена су појединачно изнад површине воде, на ивици рецепијента воде (на његовом окомитим страницама). Женкама погодују тамна места за овипозицију, која су вертикално оријентисана (Сл. 11). Јаја су отпорна на исушивање, што им омогућава да задрже виталност до момента пиљења. До индукције пиљења ларве првог ступња долази након што јаје буде поплављено или након што опадне притисак кисеоника – што је чак значајнији фактор стимулације пиљења јаја ове врсте од потапања водом или температуре (Hawley 1988). Максимална забележена дуговечност јаја износила је 243 дана (Gubler 1970a; Hawley 1988; Sane 2007). Једна женка може да положи до 950 јаја током свог живота. Просечан број је према Hawley (1988) и Sane (2007) од 300 до 350. Број положених јаја по једном гонотрофичком циклусу се генерално креће у распону од 30 до 80 (Delatte et al. 2009,

Basuki et al. 2010, Erickson et al. 2010, Aida et al. 2011, Gubler 1970b, Xue et al. 2009, Dieng et al. 2010, Waldoek et al. 2013). Код неких лабораторијских популација ове врсте уочена је аутогена продукција јаја (што значи да им за прво полагање јаја није потребан крвни оброк) (Bat Miriam and Craig 1966, Cui 1982, Klowden and Chambers 1992, Estada-Franco and Craig 1995).



Сл. 10 Јаја врсте *Ae. albopictus*

(Извор: <http://www.ento.okstate.edu>)



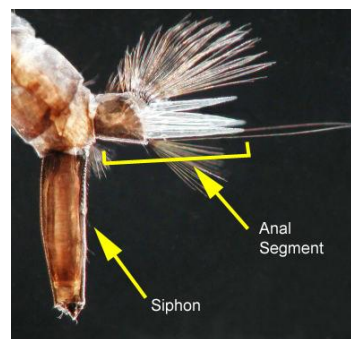
Сл. 11 Женка *Ae. albopictus* током овипозиције

(Извор: <http://wn.com>)

*Aedes albopictus* је у тропским и суптропским регионима активан током целе године, док у умереном климату презимљава у стадијуму јајета отпорног на ниске температуре, које пролази кроз дијапаузу (Hawley 1988). Дијапауза је индукована комбинацијом фотопериода и температуре. Када су одрасле женке изложене дугачким данима (>13-14 часова дневног светла) полажу недијапаузирајућа јаја, док током кратких дана продукују јаја која ће ући у дијапаузу (Hawley 1988; Novak 1992; Cane 2007). Одговор на фотопериод варира са географском ширином у оквиру умерених климатских региона. Ниже температуре такође поспешују продукцију презимљујућих јаја (Hong et al. 1971; Cane 2007). Јаја ове врсте из дела Азије и САД-а са умереном климом, могу преживети излагање температури од -10 °C током 24 сата, у великом проценту (78-99%) (Hawley et al.1987).

**Ларве** (Сл. 12) имају четири ларвена ступња и потребно им је од 5 до 10 дана за развој, у зависности од квалитета и приступачности хране (Hawley 1988), и температуре (Sivanathan 2006). На температури од 25 °C развој ларве траје 10 дана (Gomes et al. 1995). Хране се детритусом (органиска материја у распадању) на дну рецепијента воде (Сл. 15), а на

површину долазе само због усвајања атмосферског кисеоника (Сл. 13) (Hawley 1988; Cane 2007), за шта им служи респираторна цевчица смештена на крају абдомена – тзв. сифон (Сл. 14). Ларве обично налазимо у водама са високим садржајем микрофлоре и фауне, као и материја у распадању биљног и животињског порекла. Крећу се на два начина: савијањем тела (грчењем) (Сл. 16) и путем покретања четкица усног апарата (Сл. 17) (помоћу којих ларва филтрира воду долазећи тако до алги, полена, бактерија, и других микроорганизама, а уједно се и креће кроз воду) (Sivanathan 2006).



Сл. 12 Ларва *Ae. albopictus* Сл. 13 Начин усвајања кисеоника Сл. 14 Сифон ларве комарца (помоћу кога усвајају кисеоник)  
(Извор за Сл. 12 и 14: <http://fme1.ifas.ufl.edu>) (Извор Сл. 13: <http://www.visualphotos.com>)



Сл. 15 Детритус којим се хране ларве Сл.16 Кретање ларви грчењем Сл. 17 Филтрирајуће четкице усног апарата ларви  
(Извор за Сл. 15: <http://ocean.otr.usm.edu>) (Извор за сл 16: <http://www.alamy.com>)  
(Извор за Сл. 17: <http://www.sciencephoto.com>)

Лутка је по формирању бела, али јој се временом, са отврдњавањем, мења колорација (Christopher 1960; Sivanathan 2006). Има облик зареза. Трајање овог стадијума зависи од

температуре (од 8,5 до 1,7 дана). При температурама од 25 до 30 °C у просеку траје око 2 дана (Waldock et al. 2013). Лутка комарца је активна (Сл. 18), за разлику од лутки већине инсеката. Не храни се, али такође долази на површину воде због узимања атмосферског кисеоника, за шта јој служе две респираторне цевчице тзв. трубице – смештене на цефалотораксу (*cephalothorax*) (Сл. 19) (Hawley 1988; Cane 2007). Након потпуне трансформације, из лутке излази одрасли инсект (Сл. 20).



Сл. 18 Лутка у покрету



Сл. 19 Лутка током респирације



Сл. 20 Излазак имага *Ae. albopictus* из лутке

(Извор за Сл. 18: <http://www.sciencephoto.com>)

(Извор за Сл. 19: <http://fmel.ifas.ufl.edu>) (Извор за Сл. 20: <http://www.insects.org>)

**Имаго** ове врсте је дужине од 3-10 mm и има специфичне шаре, због чега се и назива азијски тиграсти комарац (Сл. 21) . Уздужна пруга од сребрно-белих љуспица налази се на тамном скутуму (*scutum*) (Сл. 22 и 23), док се на ногама налазе сребрно-бели прстенови карактеристичног распореда (Сл. 21 и 25). Палпи такође имају сребрно-беле љуспице: код женки на самом врху (Сл. 24), а код мужјака у виду прстенова (Сл. 22). Клипеус (*clypeus*) је у потпуности таман (Сл. 24).



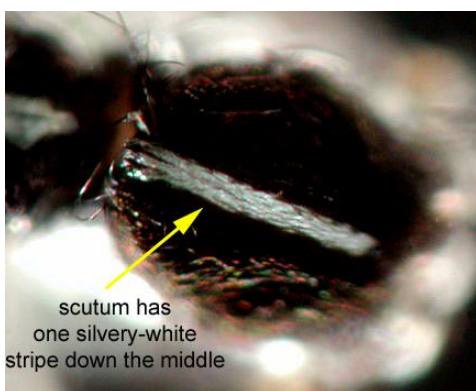
Сл.21 Женка *Aedes albopictus*

(Извор: <http://www.carolinanature.com>)

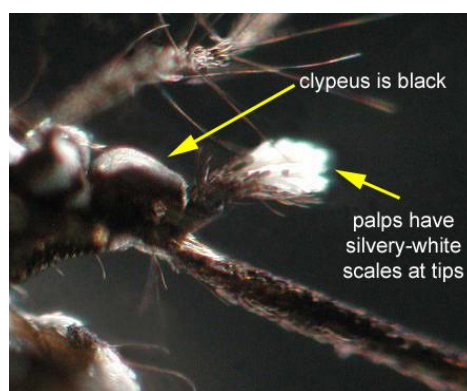


Сл. 22 Мужјак *Aedes albopictus*

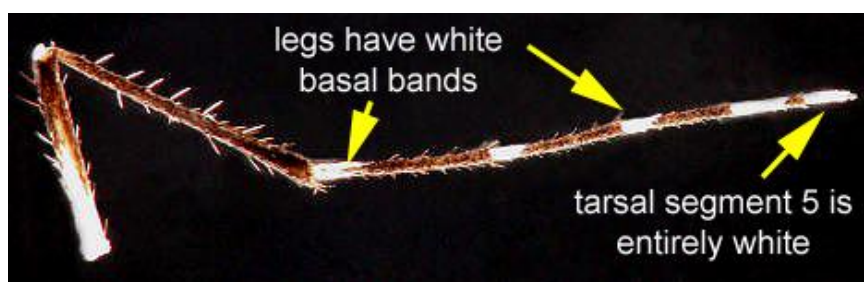
(Извор: <https://www.flickr.com>)



Сл. 23 Сребрно-бела пруга на скутуму



Сл. 24 Врхови палпа женки са сребрно-белим љуспицама и таман клипеус



Сл. 25 Карактеристични прстенови на тарзомерама задњег пара ногу

(Извор за Сл. 23, 24 и 25: <http://fmel.ifas.ufl.edu>)

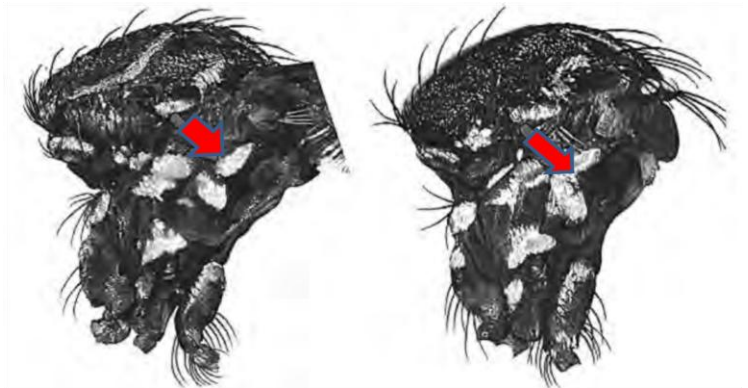
Са латералних страна торакса се такође уочава специфичан распоред сребрно белих љуспица (Сл. 26). На мезепимерону су спојене и формирају изглед слова V окренутог уназад (док су код блиске врсте *Ae. aegypti* раздвојене (Сл. 27)) (Rueda 2004). Љуспице на нервима крила су тамне. На тергиту I се латерално уочавају сребрно-беле љуспице, док се на тергитима II-VII налазе базолатералне сребрно-беле тачке (Сл. 28). Осим тога, тергити

III-VI имају дорзално по једну уску базалну пругу, која се латерално проширује (Сл. 29), али не дотиче поменуте беле тачке (Сл. 28) (Becker at al. 2010).



Сл. 26 Распоред сребрно-белих љуспица на латералној страни торакса *Aedes albopictus*

(Извор за Сл. 26: <http://fme1.ifas.ufl.edu>)



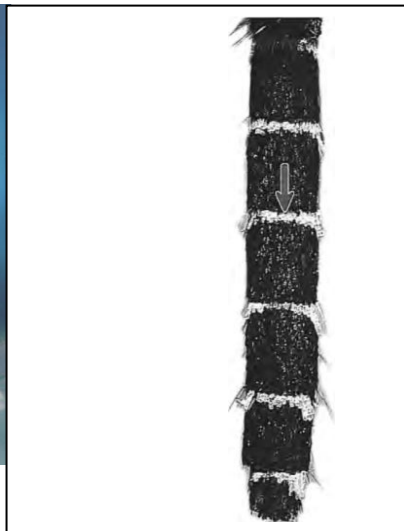
Сл. 27 Лево *Ae. aegypti* десно: *Ae. albopictus*

(Извор за Сл. 27 и 29: Rueda 2004)



Сл. 28 Дорзалне беле пруге не дотичу латералне тачке на абдоминалним тергитима

(Извор: <http://www.biogents.com>)



Сл. 29 Дорзални поглед на абдомен *Ae. albopictus*

### Исхрана адулта

Одрасли оба пола се хране цветним нектаром (Сл. 30), течношћу из трулих плодова, „медном росом“ (течни екскременти биљних ваши) и другим слатким течностима, одакле црпе потребну енергију, с тим да је женкама потребна и исхрана крвљу да би могле да

формирају јаја (Сл. 31). У одсуству крвног оброка, преживљавање женки комараца строго зависи од исхране угљеним хидратима. За сваку јединку постоји ограничавајући, најнижи садржај липида, гликогена и протеина, који одређује линију између живота и смрти. Овај ниво зависи од величине тела, а време преживљавања је линеарно повезано са логаритмом концентрације шећера у храни (Briegel et al. 2001).



Сл. 30 Исхрана нектаром  
(Извор: <http://www.flickr.com>)



Сл. 31 Узимање крвног оброка  
(Извор: <http://theassassinbug.com>)

У зависности од приступачности домаћина, женке могу чекати неколико дана на свој први крвни оброк. *Aedes albopictus* је агресивна преко дана и најчешће боде рано ујутро и касно послеподне, мада су Murray and Marks (1984) забележили да боде и ноћу. Углавном боде напољу, али може бости и унутра (Hawley 1988). Најчешће напада близу тла и има широк спектар домаћина, укључујући људе, домаће и дивље животиње, и птице. Преферира сисаре, мада понекад може напасти и поиклотермне животиње (нпр. гуштере), што је забележио Stabler (1945) у Watson (1967). Женке могу узети неколико крвних оброка током свог живота, који обично траје три до четири недеље - у зависности од временских услова и предатора (ECDC 2012). Женке најчешће узимају крвни оброк после парења, мада то не мора бити правило те се из тих разлога у близини домаћина могу уочити и мужјаци који су у потрази за женкама које се нису париле.

Након узимања крвног оброка, женка у свом средњем цреву синтетише протеолитичке ензиме који хидролизују крвне протеине у слободне аминокиселине, које се користе као



градивни материјал за синтезу протеина јајета. Стога, заустављање неког од ових процеса може узроковати заустављање развоја јајета и стерилитет (Anonymous 2015).

## Репродукција

Комарци нису спремни за репродукцију одмах након излетања. Мужјацима је потребан један дан за ротацију терминалних сегмената који носе гениталије, док је женкама потребно око два дана између излетања и копулације (Klowden 1990; Briegel unpublished data in Briegel et al. 2001; Trajer et al. 2017). Парење се одвија у лету, и траје од 10 секунди до неколико десетина секунди. Према истраживањима Venelli (2014) успешна копулација *Ae.albopictus* приликом које долази до трансфера сперме углавном траје  $63 \pm 4$  секунде, док неуспешна копулација траје краће ( $18 \pm 1$  секунду). Мужјци праве мале ројеве да би привукли женке или чекају женке које прилазе домаћину и могу се успешно парити са већим бројем женки. Према лабораторијским истраживањима, фертилан мужјак *Ae.albopictus* може да оплоди до 14 женки (у просеку 9,5 женки) ако је изолован са 20 женки у периоду дужем од 7 дана; са парењем престаје након 14 дана (Boyer et al. 2011).

До скоро се сматрало да су женке *Ae.albopictus* моногамане, али су недавна истраживања показала да оне могу бити оплођене спермом више мужјака – што је потврђено у огледима на Ријунион острву (Reunion Island, француска прекоморска територија у Индијском океану, источно од Мадагаскара) у природним условима, када је код испитиваних женки дивље популације утврђено вишеструко „очинство“ потомства у чак 26% случајева (Boyer et al. 2012).

Према истраживању Oliva et al. (2013) до појаве двостуких (ретко вишеструких) инсеминација женки *Ae.albopictus* долази ако се поменуте копулације одиграју у интервалу од 40 минута (тзв. узастопне копулације), јер у том случају нема довољно времена да у *bursi copulatrix* женке дође до формирања тзв. „чепа“ - који спречава наредне инсеминације (спречава трансфер сперме, иако до покушаја парења може доћи). Током копулације, истовремено са трансфером сперме долази и до трансфера секреција додатних жлезда мужјака тзв. пептидних матрона, које утичу на спречавање даљих инсеминација. Цео ејакулирани садржај прво бива складиштен у *bursu copulatrix*, да би већ након 2-3 минута, почео процес трансфера сперме у сперматеке (којих код женки *Ae. albopictus* има три).

Ипак, један део сперме остаје заробљен у *bursi copulatrix* заједно са пептидним матронама, где током наредних 40 минута до 6 сати значајно повећава своју густину и формира тзв. „чеп“ који чини женку непријемчивом за даља парења. Ова физичка инхибиција поновних инсеминација траје кратко (24-48 сати), након чега долази до разређивања садржаја „чепа“, и трансфера преостале сперме у сперматеке; затим долази до дугорочне манифестације ефекта непријемчивости - индукованог биохемијским одговором женке на пептидне матроне. На основу резултата овог истраживања, Oliva et al. (2013) претпостављају да до двостуке или вишеструких инсеминација дивљих женки *Ae.albopictus* долази услед парења која су се одиграла у кратком временском интервалу (и то највероватније убрзо након излетања женке или током узимања првог крвног obroка), док дужи временски интервали између покушаја парења резултују потомством које има само једног „оца“ (што је утврђено праћењем женки кроз неколико гонаторофичких циклуса). У контексту примене SIT програма, важно је напоменути да је иста група аутора доказала да је стерилисан мужјак *Ae.albopictus* способан да пренесе довољну количину сперме и пептидних матрона, да би обезбедио спречавање даљих инсеминација.

Генерално посматрано, вишеструка инсеминација женки (тј. полиандрија) током апликације SIT-а, није нужно негативан фактор, под условом да су стерилисани мужјаци довољно компетитивни у односу на дивље, нарочито у посткопулаторним аспектима који подразумевају вијабилност сперме и њену компетитивност у уласку у јаја, као и компетитивност стерилисаних мужјака за друго или наредна парења (Knipling 1955, Whitten and Mahon 2005). Ова тврдња је поткрепљена чињеницом да су женке це-це муве (*Glossina* spp.) спарене прво са стерилисаним мужјаком, а потом са фертилним мужјаком, биле фертилне мање од 50%. У случају обрнутог редоследа парења, женке су испољиле фертилитет виши од 50% (Curtis 1968). Такође, иако је Knipling иницијално сматрао да је моногамија женки пожељна, касније је закључио да она није од централног значаја (Knipling 1955, 1979; Klassen 2005 у Dyck et al. 2005), те може чак бити и озбиљно ограничење у случају значајне имиграције оплођених женки из нетретираних подручја, у SIT зону (Barclay 2005 у Dyck et al. 2005). Дакле, појава вишеструког парења женки компликује ситуацију, али ипак не дисквалификује штетног инсекта као доброг кандидата за SIT (Knipling 1955, Whitten and Mahon 2005).

## **Овипозиција**

Женке *Ae.albopictus* нису у стању да разликују места за овипозицију када је интензитет светлости испод 200 lux-а. Приликом одабира места за овипозицију преферирају воду у којој су се већ налазиле ларве, као и рецепијенте воде чији је пречник 20-30 cm. Женке које су узеле крвни оброк полажу већину јаја током првог дана овипозиције, а сваког наредног дана број положених јаја се смањује. Највећи број јаја положи између 15 и 18 часова. Фекондитет се значајно смањује ако женка није узела крвни оброк до 30-тог дана након излетања. Такође је занимљиво да женке *Ae.albopictus* испољавају значајну преференцију према боји овипозиционог супстрата. Што је он тамнији виши је број положених јаја (Lee 1994a).

## **2.2. Техника стерилизације инсеката – SIT (Sterile Insect Technique)**

Техника стерилизације инсеката (SIT) је метод генетичке контроле инсеката (која је индукована физичким поступком – ирадијацијом), специфичан за врсту која се сузбија. За разлику од биоцида, не нарушава животну средину штетним деловањем на нециљане организме. Почива на отпуштању великог броја стерилисаних инсеката у природу (Knipling 1955, 1979, 1998, Krafur 1998, Dyck et al 2005). Парење отпуштених стерилисаних мужјака са дивљим женкама води опадању репродуктивног потенцијала женки (изостаје потомство, те се смањује бројност наредне генерације), да би коначно - ако су мужјаци отпуштани у довољном броју током довољно дугог временског периода, дошло до редукције бројности или елиминације локалне популације штетних инсеката (Alphey et al. 2010).

Овим методом се инсекти углавном стерилишу зрачењем (гама или икс зрачење које индукује стерилитет), али је важно применити правилне дозе да им се не би смањила могућност конкуренције са дивљим мужјацима око женки своје врсте у процесу парења. Овако третирани инсекти се понашају као биолошки агенси који анулирају биолошки потенцијал индивидуа са којима се паре. SIT је примењив само код инсеката који се

размножавају гамогенетски тј. код којих долази до копулације. Сваки SIT програм се обично састоји из две главне фазе: а) масовног узгоја циљних инсеката у специјално дизајнираним постројењима и б) стерилизације мужјака и њиховог отпуштања у природу (Dyck et al 2005).

SIT је доказана ефикасна техника за ерадикацију или супресију популација циљних инсеката, а може се користити и у сврхе заштите одређених подручја од инфестација или реинфестација. Стерилисани инсекти су безбедни за животну средину и имају минималан утицај на нециљне организме, а техника не остаља токсичне резидуе као што се дешава у случају конвенционалног сузбијања инсеката. Појава резистентности готово да није уочена током више од 50 година примене SIT-а против штетних инсеката у пољопривреди. Осим тога, SIT програм је, у поређењу са осталим програмима сузбијања, а нарочито елиминације вектора, много мање инвазиван према животној средини (Alpheu et al. 2010).

### **2.3. Историјат и примена SIT-а у контроли различитих инсекатских врста**

Идеја о пуштању стерилних штетних инсеката који би интродуковали стерилитет у дивље популације истих врста, те на такав начин контролисали њихову бројност, почела је да се развија још 1930-тих година. Кључни истраживачи и родоначелници ове технике, који су радили неовисно један од другог, били су A.S. Serebrovskii са Московског државног универзитета, F.L. Vanderplank из „це-це“ пољске истраживачке станице у Таџгањики (данашња Танзанија) и E.F. Knipling из USDA (Америчка агенција за пољопривреду). Serebrovskii је радио на транслоцирању хромозома у оквиру популације штеточина, али огледи нису успели, услед катастрофалних услова у Русији за време Другог светског рата. Vanderplank је користио хибридни стерилитет да смањи популацију „це-це“ муве (*Glossina spp.*) у великим пољским експериментима, али су му недостајала средства да развије овај метод. Knipling и његов тим су искористили откриће H.J Muller-а да јонизујућа радијација може индуковати доминантно леталне мутације у репродуктивном систему инсеката, те су након Другог светског рата почели са применом оваг приступа у циљу искорењивања *Cochliomyia hominivorax* у САД-у, Мексику и Централној Америци (Vargas-Teran et al. у Dyck et al. 2005).

## Воћне муве и SIT

Воћне муве су екстремно деструктивне штеточине плодова воћа и поврћа. SIT је до сада успешно коришћен против медитеранске воћне муве *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) која је услед прекомерене употребе конвенционалних инсектицида развила резистентност на сва позната једињења за сузбијање ове штетне врсте. SIT је примењиван у циљу: одржавања ове муве у прихватљивој бројности (Аргентина, Израел, Шпанија, Јужна Африка), спречавања ширења (Аустралија, Гватемала, Перу), превенције настањивања услед увоза инфицираних (углавном кријумчарених) плодова (Калифорнија, Флорида) и ерадикације (Аргентина, Калифорнија, Чиле, Флорида, Мексико) у целим регионима или државама, што је допринело успостављању нових тржишта, и донело велике бенефиције – како економске, тако и у смислу заштите животне средине. SIT се такође успешно примењује у сузбијању воћних мува рода *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) (главне штеточине плодова у Западној Хемисфери). *Anastrepha ludens* (мексичка воћна мува) је елиминисана из Калифорније, Тексаса и северног Мексика, а *A. suspense* (карипска воћна мува) сузбијена на Флориди. На воћним мувама рода *Bactrocera* (најважније штеточине воћа у Азијско-пацифичком региону) SIT је такође успешно примењиван. *Bactrocera cucurbitae* (воћна мува бостана) је успешно елиминисана са свих острва архипелага Окинава у Јапану, а *B. tryoni* (квисландска воћна мува) из западне Аустралије. На Тајланду су *B. dorsalis* (орјентална воћна мува) и *B. correcta* успешно елиминисане, док је у Медитеранском региону тренутно у току програм употребе SIT-а против *B. oleae* (маслинина воћна мува) (IAEA 2016). Огледи примене SIT-а мањег обима извођени су и у Швајцарској против *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae) (трешњина мува - најзначајнија штеточина вишње и трешње у Европи), када је на једној плантажи постигнута ерадикација ове врсте током трогодишњег периода (Boller and Remund 1983).

## „Це-це“ муве и SIT

Сузбијање и ерадикација „це-це“ муве је од изузетне важности, јер је она вектор протозое *Trypanosoma brucei (gambiense)* - проузроковача болести спавања (код човека) нагане (код стоке). Због ризика од „це-це“ муве, велики део најбољег афричког земљишта остао је некултивисан (нарочито у долинама река и влажним подручјима, где је потенцијал за сточарско-ратарску производњу добар). SIT се примењује већ неколико деценија против

најзначајнијих врста „це-це“ муве. Тако су нпр., као резултат комбиновања SIT-а и конвенционалних метода, три врсте (*Glossina morsitans submorsitans*, *G. palpalis gambiensis*, *G. palpalis palpalis*) искорењене на површини од 3000 km<sup>2</sup> у Буркини Фасо (Poltzar and Cuisance 1984 у Dyck et al. 2005) и једна врста (*G. tachinoides*) на површини од 1500 km<sup>2</sup> у Нигерији (Takken et al. 1986 у Dyck et al. 2005). Иако је ова техника успешно примењена, програм се, нажалост, није изводио на довољно великим површинама, тако да резултати нису били одрживи. Занзибар је 1997. год. занично ослобођен „це-це“ муве (врста *Glossina austeni*) (Vreysen et al. 2000 у Dyck et al. 2005), што је постала основа за кампању њене ерадикације у још 37 суб-сахарских афричких држава, уз помоћ Светске здравствене организације - WHO (World Health Organization), Организације за храну и пољопривреду - FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) и Међународне агенције за атомску енергију - IAEA (International Atomic Energy Agency) (IAEA 2016).

#### *Cochliomyia hominivorax*, *Chrysomya bezziana* и SIT

Сузбијање и ерадикација *Cochliomyia hominivorax* (New World Screwworm) и *Chrysomya bezziana* (Old World Screwworm) (Diptera: Calliphoridae) су од изузетног значаја, јер су њихове ларве проузроковачи веома опасних мијаза топлокрвних животиња и човека. Могу довести до огромних губитака у сточарству услед високог смањења млечности, квалитета меса, као и честог угинућа стоке. *Cochliomyia hominivorax* је инсекатска врста на којој је SIT метод први пут примењена на острву Sanibel Island (47 km<sup>2</sup>) 4 km од обале Флориде 1951. год. (извели су је Knipling, Bushland и Baumhover). Иако у првом покушају није постигнута ерадикација (услед близине копна и имиграције фертилних инсеката), бројност популације је значајно смањена (Bushland 1960 у Dyck et al. 2005). Ова група научника је наставила истраживања, и већ 1954. год. су успели да искорене *C. hominivorax* на острву Куракао (Холандски Антили) (Baumhover et al. 1955 у Dyck et al. 2005). До 1959. год. су је у потпуности елиминисали и са Флориде (где се више никада није регистрована) (Dyck et al. 2005). Иако је *C. hominivorax* некада била ендемска врста Западне Хемисфере, применом SIT-а је успешно искорењена из САД-а, Мексика, Централне Америке и Панаме. Током 1988. год. присуство ове врсте је потвђено у Либији, након чега је у врло кратком року почела примена SIT-а да би се спречило ширење у друге афричке земље и медитеренски регион (Lindquist et al. 1992). Ова акција је резултовала ерадикацијом *C.*

*hominivorax*, и спречила огромне финансијске губитке. *Chrysomya bezziana* је ендемска у Африци и јужној Азији. Иако није присутна у Аустралији, представља потенцијалну претњу, услед распрострањености у Папуи Новој Гвинеји и Индонезији. Услед тога, Аустралија интензивно ради на припреми примене SIT-а у случају интродукције *Ch. bezziana* (IAEA 2016).

### Coleoptera и SIT

Гундељи (Coleoptera: Scarabeidae) су значајне штеточине коренастог поврћа. Период летења може бити прецизно прогнозиран, и ограничен је на неколико недеља – сваке треће године. Током 1959. год. и 1962. год, Horber (1963) је применио SIT технику у два огледа у природи на *Melolontha vulgaris* – обични гундељ, на 30 ha пољопривредног земљишта у Швајцарској. Сакупио је мужјаче помоћу светлосних клопки, стерилисао их зрачењем, и вратио у природу. У првом огледу је дивља популација редукована за 80%, а у наредном је потпуно елиминсана (Dyck 2005). У периоду од 1971. до 1973. год. SIT је примењен против *Anthonomus grandis grandis* – памукова пипа (Coleoptera: Curculionidae) у јужном Мисисипију (САД), и резултати су били веома добри, иако није постигнута потпуна ерадикација. Након што се инвазивна врста *Cylas formicarius* (Coleoptera: Curculionoidea, Brentidae) – штеточина слатког кромпира и озбиљна претња пољопривредној производњи, појавила у Јапану, велика пажња је посвећена њеном сузбијању у периоду од 1994. до 1999. год., употребом инсектицида и синтетичких полних феромона, што је сузбило штеточину за 90% (Yasuda 2000). Након тога примењиван је SIT (стерилисани инсекти отпуштани су и из ваздуха и са земље) да би 2002. год. коначно дошло до ерадикације (Kohama et al. 2003).

### Lepidoptera и SIT

SIT се веома интензивно примењује у контроли Lepidoptera (за врсте чије гусенице наносе огромне штете у пољопривредној производњи), нпр: сузбијање *Cydia pomonella* - јабучни смотавац (Lepidoptera: Tortricidae) у јабукама и крушкама у Канади, као и *Thaumatotibia leucotreta* (Lepidoptera: Tortricidae) у цитрусима у јужној Африци; превенција настањивања *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae) у памуку у Калифорнији, и њена ерадикација у југозападном делу САД-а и северозападном Мексику; као и ерадикација

инвазивног аустријског обојеног јабучног смотавца *Teia anartoides* (Lepidoptera: Noctuoidea, Erebidae) на Новом Зеланду (IAEA 2016).

## 2.4. Историјат примене SIT-а у сузбијању комараца

Сузбијање вектора патогена, нарочито сузбијање комараца, је тежак и комплексан проблем, што показује константна појава и ширење болести чије проузроковаче преносе комарци.

Још 1960-тих и 1970-тих година извођена су многобројна истраживања примене SIT програма у сврху сузбијања комараца. Већина их се односила на добијање одговора на специфична истраживачка питања, и није се одмах очекивало смањење бројности популације. Ипак, покушано је и неколико акција сузбијања и/или потпуне елиминације. Нажалост, ови програми нису били довољног обима да би се показали ефикасним у неизолованим подручјима.

Први велики успех постигнут је са *Culex quinquefasciatus* 1967. год у тадашњој Бурми (садашњи Мјанмар) када је успешно елиминисана изолована популација ове врсте комараца (Laven 1967, Benedict and Robinson 2003). У овом пројекту су коришћени комарци стерилисани путем тзв. CI (цитоплазматична некомпатибилност индукована бактеријом из рода *Wolbachia*).

Остали примењивани програми су се генерално заснивали на потпуној или парцијалној стерилизацији мужјака путем примене девијације хромозома, CI, ирадијације, хемостерилизације, или дисторзије односа полова путем контроле мејотичких процеса (Benedict and Robinson 2003). Тако је током 1968. и 1969. год. на Флориди (САД) прво успешно извршена редукција, а потом и елиминација *Cx. quinquefasciatus* – путем отпуштања мужјака стерилисаних хемостерилизацијом (Patterson et al. 1970), док је 1970. год. у близини Монпељеа (Француска) значајно редукована локална популација *Culex ripiens* услед отпуштања парцијално стерилисаних мужјака који су имали транслокацију хромозома (Laven et al. 1971, Benedict and Robinson 2003).



Најамбициознији пројекат који је комбиновао све поменуте приступе стерилизације, и укључио еколошке студије и модерне принципе управљања, био је заједнички пројекат WHO и Индијског одбора за медицинска истраживања (Indian Council of Medical Research - ICMR) у борби против *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* и *Anopheles stephensi* у Индији током 1973. и 1974. године. Током овог подухвата била су спровођена отпуштања стерилисаних мужјака *Cx. quinquefasciatus* у огромном броју и тек што се почело са отпуштањима *Ae. aegypti*, пројекат је био прекинут (услед чега није реализовано отпуштање *An. stephensi*) (Pal 1974, Benedict and Robinson 2003). Ипак, током реализације је доказано да се и *Ae. aegypti* може масовно узгајати (а не само *Cx. quinquefasciatus*- што је већ раније доказао Patterson (1970)) и да се раздвајање полова може вршити на основу величине лутке са прецизношћу од 99,8%. Ипак, ови напори су резултирали само скромним утицајем на смањење густине дивље популације (што се приписало неочекиваној имиграцији спарених женки из околног подручја у третирану зону).

Први успешан SIT пројекат у борби против маларичних комараца изведен је у Ел Салвадору 1972. године, када је извршена елиминација изоловане *An. albimanus* популације на подручју од 15 km<sup>2</sup> (Lofgren et al. 1974), али је планирани проширени пројекат заустављен због грађанског рата.

У јужној Калифорнији (САД) у периоду од 1977. до 1982. године извршена је примена SIT-а у неколико различитих огледа у циљу сузбијања *Culex tarsalis* (за стерилизацију мужјака се користила хемостерилизација, или транслокација хромозома), али није констатована редукција популације. Утврђено је једино да се мужјаци са транслокацијом хромозома могу масовно производити, те да могу поднети транспорт (у стадијуму лутке) у природне услове, као и да могу преживети у природним условима и у стадијуму лутке и у стадијуму одраслог (Asman et al. 1979). Milby et al. (1980) су констатовали слабу конкуритивност мужјака (са транслокацијом хромозома) у природним условима и предложили да се за масовни узгој користе велики кавези постављени у природу. Reisen et al. (1982) су утврдили да су мужјаци стерилисани ирадијацијом и обојени флуоресцентним прахом—интродуковали свега 11% стерилитета у тестирану популацију и да нису били довољно конкуритивни.

Без обзира на циљну врсту комараца, неуспеху примене SIT програма у поменутом временском периоду, допринели су различити узроци техничке природе: (1) продукција мужјака испод жељеног нивоа; (2) помањкање адекватне виталности мужјака; (3) имиграција женки у третирана подручја. Ипак, наведени проблеми су обезбедили драгоцене лекције, те усмерили и унапредили SIT истраживања, као и његову примену у борби против комараца (Benedict and Robinson 2003).

## **2.5. Савремени приступи у генетичкој контроли комараца**

Од периода (1960.-1980. год.) када су вршена отпуштања стерилисаних мужјака комараца, значајно су унапређене постојеће (Benedict and Robinson 2003), а развијено је и неколико нових техника (приступа); тако да се интересовање за употребу класичног SIT-а и других генетичких метода сузбијања вектора, у последње време поново пробудило (Alphey et al. 2010).

Нови приступи укључују:

- Унапређења која се односе на употребу Глобалног система за позиционирање (Global Positioning System - GPS) и Географског информационог система (Geographic Information System - GIS) представљају једну од прекретница у примени SIT-а (Alphey et al. 2010). Овакви системи подразумевају употребу софтвера и различитих метода мапирања, који се могу користити током надзора вектора, те планирања и реализације SIT операција. Нарочито су корисни током примене оваквих програма на великим површинама (на нпр. неколико десетина хиљада квадратних километара), јер омогућавају систематско чување огромног броја података (нпр. о присуству или одсуству вектора, њиховој релативној бројности, броју оболелих људи у одређеном временском периоду и сл.). Овакви подаци омогућавају прецизне просторне и временске анализе (IAEA 2006) које су неопходне за доношење правовремених одлука у процесу планирања и извођења операција контроле вектора:

- Генетичку модификацију комараца, нпр. уношење доминантног леталног гена у популације комараца вектора (RIDL); трансгена модификација комараца који носе блокирајуће гене (блокирају развој патогена у комарцима); развој система испољавања гена („gene drive“).

- Унапређење технике цитоплазматичне некомпатибилности (CI) која изазива стерилност, а коју проузрокује ендосимбиотска бактерија *W. pipientis* чији су сојеви високо специјализовани за различите врсте комараца (па чак и за различите популације исте врсте комараца); употреба одређених сојева ове бактерије у сврху скраћења животног века комараца и редукције векторског потенцијала/компетентности (путем блокирања развоја патогена у комарцу).

### **2.5.1. Уношење доминантног леталног гена у популације вектора (RIDL принцип)**

Компанија Oxitec Ltd (Oxford, United Kingdom) је развила технику названу RIDL (Release of Insects Carrying a Dominant Lethal Gene) базирану на употреби генетички модификованих сојева врста *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* – који се могу користити у сврхе сузбијања својих дивљих популација (Thomas et al. 2000, Alphey et al. 2007, Phuc et al. 2007, Alphey et al. 2010). Ови сојеви носе летални ген чије се дејство испољава у условима недостатка тетрациклина током развоја ларви у природним условима (Harris et al. 2011). RIDL принцип се у последње време све чешће користи у програмима сузбијања комараца, али и у масовном узгоју - при генетичком раздвајању полова – када се индукује леталност специфична само за женке (Thomas et al. 2000).

На основу брзине и начина деловања, методе генетичког сузбијања комараца (у које спада и RIDL принцип) су подељене на четири категорије (Gentile et al. 2015):

1. Рана елиминација оба пола (Early acting bisex - EBS) - када услед парења дивљих женки са отпуштеним мужјацима не долази до продукције вијабилног потомства. У случају примене SIT-а, услед отпуштања стерилисаних мужјака (који ће се парити са дивљим женкама), долази до веома раног угињавања потомства у току ембриогенезе.

2. Рана елиминација женки (Early acting female-killing – EFK), при чему парење дивљих женки са отпуштеним мужјацима не резултује женским потомством ( оно није вијабилно),

него само мушким (које преживљава) и које је уједно и носилац – по женке леталног гена који преносе на наредне генерације.

3. Касна елиминација оба пола (Late acting bisex – LBS), при чему парење дивљих женки са отпуштеним мужјацима резултује потомством оба пола које преживљава током акватичних стадијума и угињава непосредно пре или одмах након излетања адулта. Потомство отпуштних мужјака са RIDL геном угињава у стадијуму одрасле ларве, лутке или непосредно након излетања адулта (Phuc et al. 2007). Бенефит касног угињавања је конкуренција RIDL ларви за храну и простор са дивљим ларвама, што повећава ефикасност сузбијања услед редукције стопе преживљавања дивљих ларви. У случају примене стерилизације ирадијацијом, не долази до овакве конкуренције ларви због угињавања потомства током ембриогенезе, што може водити повећању стопе преживљавања преосталих дивљих ларви у природи, те може делимично или потпуно неутралисати ефекат примене SIT програма (Rogers and Randolph 1984, Dye 1984, Phuc et al. 2007). RIDL програм обезбеђује бољу одрживост програма сузбијања, те стога може омогућити смањење потребног броја отпуштених мужјака, што директно утиче на снижавање трошкова апликације (Phuc et al. 2007).

4. Касна елиминација женки (Late acting female-killing - LFK) - када парење дивљих женки са отпуштеним мужјацима резултује потомством оба пола, али ће до стадијума одраслог преживети само мушко потомство, које ће затим даље ширити летални ген. Трансгене ларве и лутке женског пола ће уинути пре стадијума одраслог, али ће учествовати у конкуренцији са ларвама дивље популације.

За категорије EFK и LFK се иницијално мислило да су ефикасније од EBS и LBS, јер популација хетерозиготних мужјака служи као додатни резервоар леталног гена, те може продужити „животни век“ интервенције путем додатног ширења гена кроз популацију. Међутим, таква популација мужјака може истовремено служити и као резервоар за опстанак дивље популације. Када се примењује EFK и LFK методе јединкама које настају а) путем парења дивљих женки и дивљих мужјака (50% вероватноће) придружују се и б) јединке настале путем хетерозиготних парења – када се са дивљим женкама паре мужјаци који су носиоци леталног гена (50% вероватноће) (Gentile et al. 2015). Варијанта б)

подразумева следећи процес: у F1 генерацији целокупно потомство, проистекло из парења дивљих женки и отпуштених лабораторијских хомозиготних мужјака (који носе доминатно летални ген - специфичан за женке) наслеђује једну копију трансгена леталног за женке - тако да све „ћерке“ угињавају, док су „синови“ хетерозиготни (и имају 50% трансгена од „оца“ + 50% дивљих гена од „мајке“). Такви F1 хетерозиготни „синови“ ће, након парења са дивљим женкама, пренети трансген само на половину свог потомства, док ће друга половина потомства имати дивље гене. У наредној генерацији (F2) ће се проценат леталих гена у потомству још више смањити, док ће број потомака са дивљим генима порасти. Тако да ће након примене EFK и LFK метода летални трансген бити брзо елиминисан из циљне популације (осим ако се не буде одржавао путем периодичних отпуштања додатних хомозиготних мужјака) (Alpheu et al. 2013), али ће уједно и допринети одржавању (истрајавању) дивље популације у природи (путем формирања потомства дивљег типа насталог услед парења хетерозиготних мужјака и дивљих женки) (Gentile et al. 2015), што никако није пожељна особина у програмима сузбијања комараца. С друге стране, ако се примењују EBS и LBS методе – комарци дивљег типа могу настати само путем парења дивљих мужјака и дивљих женки (Gentile et al. 2015).

У компанији Oxitec Ltd је до сада генетски модификовано (RIDL) неколико сојева комараца (нпр. *Ae. aegypti* OX513A, *Ae. albopictus* OX3688) који осим леталног гена, носе и DsRed флуоресцентни маркер јасно видљив код ларви и представља корисно средство при контроли квалитета током продукције и праћења у природи (Phuc et al. 2007). Сој *Ae. aegypti* OX513A се примењује у Азији и Латинској Америци, а такође има потребна одобрења за увоз и тестирање у Бразилу, Кајманским острвима, Француској, Индији, Малезији, Сингапуру, Тајланду, САД-у и Вијетнаму. Код овог соја раздвајање полова се ради механички, а потомство отпуштених мужјака угињава пре стадијума одраслог (у питању је категорија: LBS) (Phuc et al. 2007, Anonymous 2018). Код *Ae. albopictus* OX3688, женке не могу да лете, што омогућува отпуштање искључиво мужјака, а летални ген се одржава у природи (категорија LFK) (Labbé et al. 2010, 2012).

### 2.5.2. Генетски модификовани комарци

Трансгенетски креирани организми су део генетски модификованих организама у које су интродуковани гени или генетички материјал других врста, путем примене техника генетичког инжењеринга (McGraw and O'Neill 2013). Постоји неколико приступа за производњу трансгених комараца који носе гене који омогућавају блокирање развоја проузроковача болести у њиховом телу (Alphey et al. 2013). Циљ је отпуштање трансгених комараца у природу, што би, у идеалном случају, временом требало да доведе до замене дивље популације – новим, генетички модификованим сојем комараца који је резистентан на патогене (Labbé et al. 2010). Међутим, утврђено је да би се временом учесталост оваквих гена у циљној популацији комараца смањивала, јер „животни век“ овакве интервенције није довољно дуг да би условила епидемиолошки користан ефекат, те се тренутно интензивно ради усавршавању система који би допринели одржавању ових гена у популацији комараца у довољном уделу (Alphey et al. 2013).

### 2.5.3. Употреба бактерије *Wolbachia pipientis*

*Wolbachia pipientis* (Alphaproteobacteria, *Rickettsiales*) (Calvitti 2011) је ендосимбиотска бактерија (наследна по „мајци“) која се налази у око 60% инсекатских врста, али и у неким раковима, пауцима и нематодама (Werren et al. 2008, Brelsfoard and Dobson 2011a). Различити сојеви *Wolbachia*-е могу бити вештачки интродуковани у комарце који ће бити отпуштени у природу, и дејствовати у њиховим дивљим популацијама на различите начине и то путем утицаја на: репродукцију комараца (услед индукције цитоплазматичне некомпатибилности - CI); скраћење дужине живота; или редукцију репликације патогена у њима (Iturbe-Ormaetxe et al. 2011).

- Цитоплазматична некомпатибилност (CI – cytoplasmic incompatibility) и техника некомпатибилности инсеката (ИТ - Incompatible Insect Technique) - је заправо природни механизам настајања стерилитета (када женке не дају потомство ембриони нису вијабилни) услед некомпатибилности сперме мужјака и јаја женки, до чега долази у случају парења женке и мужјака са различитим сојем *Wolbachia*-е или у случају парења женке која није инфицирана *Wolbachia*-ом са мужјаком који поседује неки од сојева *Wolbachia*-е.

Техника отпуштања мужјака инфицираних одговарајућим сојем *Wolbachia*-е, који је некомпатибилан са сојем *Wolbachia*-е у женкама дивље популације назива се техника некомпатибилности инсеката (ИТ) и може се користити за сузбијање комараца (Calvitti et al. 2010). Овакви мужјаци изазивају стерилитет у дивљој популацији комараца. У случају примене ИТ-а се сој *Wolbachia*-е, који се налази у отпуштеним мужјацима, не одржава у популацији (јер је *Wolbachia* наследна само по мајци и то само у случају компатибилних парења), него је потребно вршити њихова константна отпуштања у великом броју, да би дошло до сузбијања дивље популације комараца (McGraw and O'Neill 2013), слично као и код примене класичног SIT програма. Такође је од изузетне важности спречити случајно отпуштање инфицираних женки са мужјацима (што се може десити због, још увек, недовољно прецизне технике сепарације полова). Отпуштање таквих женки би могло проузроковати ширење новог соја *Wolbachia*-е у дивљој популацији комараца (услед парења инфицираних мужјака и женки - што би резултовало вијабилним потомством инфицираним поменутиим сојем *Wolbachia*-е), те би то временом могло условити делимичну или потпуну замену популације уместо њеног сузбијања. У том случају ИТ апликација базирана на примењеном соју *Wolbachia*-е више не би деловала у смислу редукције бројности дивље популације. Да би се ово спречило инфицирани комарци би се могли стерилисати малим дозама радијације (нпр. 20 Gy за *Ae. albopictus*), што би потпуно стерилисало женке, док на мужјацима не би значајно утицало (Calvitti 2014 – лична комуникација). Насупрот овоме, O'Conner et al. (2012) сматрају да не постоји превелика вероватноћа за замену природне популације услед случајно отпуштених инфицираних женки – због њиховог нижег фекондитета, повишеног морталитета ларви и краћег животног века адулта (Brelsfoard and Dobson 2011b).

У новије време ИТ техника је усавршена и почела је њена примена у сузбијању врста комараца код којих то раније није рађено (нпр. *Ae. albopictus*, *Ae. polynesiensis*) (Calvitti et al. 2010, O'Conner et al. 2012).

- Скраћење животног века комараца - показало се да интродукција сојева *wMelPop* *Wolbachia*-е (изоловане из *Drosophila melanogaster*) у *Ae. aegypti*, условљава пренамножење ове бактерије у соматским ткивима комарца (мозга, ретине и мишића лета), што узрокује цитопатолошки ефекат, те редукује животног век адулта. На овај начин

се индиректно спречава трансмисија вируса и паразита, путем селективне елиминације старијих женки из популације (угињавају пре завршетка инкубационог периода, те нису у могућности да пренесу патогене). Предвиђања теоретских модела сугеришу да ова техника може резултовати редукијом трансмисије болести од 80 до 100% (Brownstein et al. 2003, Rasgon et al. 2003, Cook et al. 2008).

#### - Редукија и инхибиција репликације вируса и развоја других патогена у комарцима

Интродукција соја *wMel* у популацију *Ae. aegypti*, је редуковала могућност преношења вируса денге и чикунгуње (Bian et al. 2010; Moreira et al. 2009, Iturbe-Ormaetxe et al. 2011). Осим тога, иако се за сој *wMelPop* сматрало да утиче само на скраћење животног века комарца, његово ињектирање у адулте *An. gambiae*, резултовало је инхибицијом развоја *Plasmodium berghei* (проузроковача маларије афричких глодара). (Kambris et al. 2010). Такође, интродукција соја *wMelPop* у *Ae. aegypti*, резултовала је инхибицијом развоја нематода у комарцу (Kambris et al. 2009). Механизам инхибиције развоја патогена у комарцу је још увек нејасан, али се сматра да може бити узрокован директном конкуренцијом неких сојева *Wolbachia*-е и патогена за ограничене ћелијске ресурсе (потребне за репликацију или развој) (Iturbe-Ormaetxe et al. 2011); док је у случају присуства *wMelPop* у *Ae. aegypti* утврђена чак и повећана продукција великог броја имуних гена (Kambris et al. 2009). Ипак, према Hoffmann et al. (2011) сој *wMel* - који има директан утицај на пренос патогена у комарцу, се генерално показао ефикаснијим у смислу редукије трансмисије болести у односу на сој *wMelPop-CLA* (CLA - cell-line-adapted) - који најчешће само редукује дужину живота комараца (Hoffmann et al. 2011).

Када су у питању технике које се заснивају на утицају одговарајућих сојева *Wolbachia*-е на скраћење дужине живота комараца и/или редукију репликације патогена у женкама дивље популације, од круцијалног значаја је ефикасно ширење и одржавање оваквих сојева *Wolbachia*-е у дивљој популацији (Iturbe-Ormaetxe et al. 2011). Циљ оваквих програма је потпуна замене дивље популације комараца, новом популацијом која има редукован векторски капацитет (ако је у питању сој *Wolbachia*-е који изазива скраћење животног века комарца) или редуковану компетенцију вектора (ако је у питању сој *Wolbachia*-е који утиче на редукију или инхибицију развоја патогена у женкама) (Labbé



et al. 2010, McGraw and O'Neill 2013). Ово се постиже отпуштањем одговарајућег броја инфицираних комараца (и мужјака и женки) који би услед међусобних парења ширили жељени сој *Wolbachia*-е у природи, док у случају парења оваквих јединки са мужјацима или женкама дивље популације не би дошло до продукције вијабилног потомства (захваљујући цитоплазматичној некомпатибилности) те би стара дивља популација полако нестајала.

#### **2.5.4. Савремена примена класичног SIT принципа у сузбијању комараца**

Услед глобалног пораста болести чије проузроковаче преносе комарци, и уочених ограничења постојећих конвенционалних метода сузбијања вектора, SIT се током последње деценије враћа у програме сузбијања комараца „на велика врата“. Развијене су нове технике и модификације SIT-а, а интензивно се ради и на усавршавању и тестирању савремене опреме и протокола масовног узгоја, поступака стерилизације и отпуштања. Такође, оцењивање квалитета отпуштених мужјака је постало много софистицираније (Lees et al. 2015). Неколико истраживачких група је показало одличан напредак у испитивању ефикасности оваквих апликација, како у огледима у полу-природним условима, тако и у пилот пројектима у природи.

У Италији се од 2004. год. чине велики напори за увођење SIT технике у програме сузбијања *Ae. albopictus* (Bellini et al. 2013a). У циљу унапређења примене ове технике испитивани су: оптимална дозиметрија гама зрацима (Balestrino et al. 2010), капацитет дисперзије мужјака (Bellini et al. 2010), и конкурентност стерилисаних мужјака у полу-природним условима (Bellini et al. 2013b). Такође је развијен и поуздан квантитативни систем мониторинга базиран на овипозиционим клопкама (Albieri et al. 2010, Carrieri et al. 2011 a, b) који обезбеђује мерење ефикасности отпуштених стерилисаних мужјака у различитим урбаним локалитетима помоћу поређења броја јаја положених у овипозиционе клопке на контролној територији и у подручју примене SIT-а. У периоду од 2005. до 2009. год. изведено је 5 огледа у 3 мала града у северној Италији. Укупно је отпуштено око 2 милиона стерилисаних мужјака. Индукован је значајан ниво стерилитета у локалну популацију *Ae. albopictus*, и утврђено је да када ниво стерилитета јаја достигне вредности

између 70-80%, долази до сличне редукције броја јаја у овипозиционим клопкама и редукције броја адулта; док ниво стерилитета јаја испод 50% нема нарочитог утицаја на редукцију популације адулта. Ова група аутора је оценила да је потребно достићи вредност стерилитета јаја од приближно 81%, да би се обезбедило задовољавајуће сузбијање локалне популације *Ae. albopictus*, пошто је проценат индукованог стерилитета јаја потребан за обезбеђивање 50% редукције популације  $SL_{50}=63,26\%$ , а за редукцију 90% популације  $SL_{90}=77,96\%$  (Bellini et al. 2013a).

У Судану је још од 2004. год почео координисани пројекат за сузбијање *An. arabiensis* употребом SIT-а (IAEA 2005). Прва фаза пројекта подразумевала је прикупљање података из станишта ларви, извођење генетичких студија, и проучавање понашања стерилисаних и дивљих комараца. Због специфичности услова и неопходности транспорта стерилисаних мужјака ваздушним путем до места њиховог отпуштања (услед велике удаљености – од око 400 km од узгајалишта комараца и извора ирадијације), Helinski et al. (2008) су прво извели огледе у полу-природним условима и утврдили да је преживљавање лабораторијских (и стерилисаних и фертилних) одраслих мужјака током транспорта било на задовољавајућем нивоу (>94%), као и да су стопе парења дивљих женки са лабораторијским фертилним мужјацима и дивљим мужјацима у контролним кавезима биле сличне (око 60% оплођених дивљих женки током 1-2 ноћи у оба случаја). Експерименти компетитивности стерилисаних и дивљих мужјака нажалост нису довели до жељених резултата. Истраживања су затим настављена у природним условима, где су Ageer et al. (2014) на основу MRR технике обележавања, отпуштања и поновног хватања (Mark-Release-Recapture technique) установили да су мужјаци *An. arabiensis* стерилисани ирадијацијом учествовали у ројењу (42% - 97%).

На Ријунион острву су Oliva et al. (2012a) проучавали ефекте ирадијације на полно сазревање мужјака *Ae. albopictus* и њихову успешност парења, као и компетитивност стерилисаних и дивљих мужјака у полу-природним условима. Добијени резултати сугеришу да би при односу отпуштања мужјака 5:1 (стерилисани:дивљи) у датим условима, дошло до редукције фертилитета дивље популације за 50%.

## 2.6. Могуће последице отпуштања *Wolbachia* инфицираних и генетички модификованих комараца

За било који самоодрживи генетички систем, кључна питања се односе на иницијалну способност за ширење и степен одржавања жељеног фенотипа, те могућност да их еволутивни одговори подрже или испоље неки други нежељени ефекат. Тако нпр. у случају примене *Wolbachia*-е у сврхе индуковања комараца резистентних на пренос патогена, може доћи до појаве коадаптације интродукованог соја *Wolbachia*-е и самих комараца, те услед тога редукције степена поменуте резистентности. Последице такође могу укључити селекцију сојева вируса резистентних на *Wolbachia*-у, или пак, сојева вируса који развијају виши титар у људима – што су свакако нежељене особине (Alphey et al. 2013). Експеримент са женкама *Ae. aegypti* које су биле инфициране сојем wMelPop, показао је редукцију способности искориштавања крви у процесу формирања јаја. Ова појава је била испољена у високом степену након храњења крвљу миша, морског прасета или пилета (мали број положених јаја, праћен ниском стопом пиљења јаја), док је у случају исхране човековом крвљу била много блаже изражена. Након одстрањивања *Wolbachia*-е (употребом антибиотика) развој јаја је поново био нормалан (без обзира који је извор крви био у питању) (McMeniman et al. 2011). Иако *Ae. aegypti* има јаку преференцу за исхраном на човеку, ипак није апсолутно антропофаган (може се хранити и на другим домаћинима) (Scott et al. 1993, Siriyasatien et al. 2010), а наведени резултати сугеришу да женке *Ae. aegypti* инфициране wMelPop могу развити јаку селекцију на повећање преференце за бодeње човека – што је централна особина преноса патогена специфичних за човека, као и стопе узнемиравања (Alphey et al. 2013).

Такође, када је у питању летални систем за женке (RIDL принцип), ген - кога носе преживели „синови“, брзо нестаје из популације и услед високо негативног утицаја на степен виталности комараца који га носе (тзв. „high fitness cost“). С друге стране, „блокирајући“ гени имају знатно мањи утицај на „fitness cost“, али ће се и њихова учесталост такође смањивати у популацији, мада много спорије (Alphey et al. 2013).

Да би „блокирајући“ гени имали епидемиолошки користан ефекат, морају бити присутни у значајном уделу у циљној популацији комараца, те задржавати ефикасност кроз много генерација. Како се то може постићи? Потребан је систем који ће повисити учесталост

таквих гена у популацији током времена, упркос поменутиим недостацима. Такви системи су названи: „системи испољавања гена“ („gene drive systems“). У питању су елегантни генетички механизми (дугорочни и самоодрживи) помоћу којих се врши ширење гена који могу блокирати развој патогена у комарцима. Али, као и код конвенционалне и биолошке контроле, поставља се питање недостатка контроле над системом испољавања гена, након што једном буде отпуштен у природу, његове непознате еволутивне путање, и немогућности повратка на стање пре отпуштања у случају нежељених појава у природи (Alphey et al. 2013).

Из ових разлога самоодрживи системи се сматрају високо ризичним. Такође, иако би трошкови употребе оваквих система („испали метак и заборави“), били на први поглед мањи (јер је, након иницијалног отпуштања, потребно отпуштати мање инсеката), они би врло брзо порасли услед потребног мониторинга након отпуштања – да би се утврдио статус учесталости оваквих система испољавања гена у популацији комараца, њихова стабилност и ефикасност. Осим тога, за јавно мњење и законску регулативу би могло бити тешко упоређивање релативно добро познатих ризика и опасности постојећих система борбе против комараца (и патогена које преносе) са непознатим аспектима нове технике, која можда и неће деловати, иако потенцијално нуди велике бенефите (Alphey et al. 2013).

## **2.7. Оптимизација класичне SIT технике**

Иако бројне истраживачке групе раде на развијању, усавршавању и тестирању поменутих нових техника - базираних на трансинфекцији и генетичким трансформацијама комараца, употреба класичног SIT-а – као познате и разрађене технике је актуелна и све више примењивана у свету. Примена основних постулата на којима овај принцип почива је неопходна, не само у класичној апликацији, него и у новим приступима (модификацијама SIT-а), те се и даље интензивно ради на усавршавању и унапређењу сваког појединог корака овог метода.

У приоритетете за решавање проблематичних тачака тзв. „уских грла“ SIT програма спадају: оптимизација и стандардизација протокола масовног узгоја, стандардизација

тестова контроле квалитета; усаршавање начина сепарације полова; усавршавање процеса ирадијације; истраживања екологије и понашања комараца (који утичу на примену програма - конкуритивност мужјака, дисперзија, дуговечност); дефинисање односа и учесталости отпуштања мужјака; руковање комарцима, транспорт и начин отпуштања; просторни и временски распоред отпуштања мужјака; развој нових маркера за мониторинг отпуштених комараца; као и начина ефикасне евалуације програма (IAEA 2014a).

### **2.7.1. Масовни узгој**

Масовна производња (узгој) инсеката је важна компонента сваког генетичког програма контроле штетних инсеката, који захтева отпуштање великог броја индивидуа у природу (IAEA 2010). Производња великог броја инсеката се одвија у посебним постројењима за масовни узгој, у којима се инсекти гаје у условима различитим од природних, и бивају подвргнути многим неприродним процесима (нпр. употреба вештачке хране, контролисани услови окружења - температуре, влажности и фотопериода, гајење у високим густинама, колонизација, стерилизација) (Clarke and McKenzie 1992, Madakacherry et al. 2014). Разлике између масовно узгојених и дивљих комараца почињу да расту током колонизације. Колоније постају све хомогеније и генетички се све више разликују од дивље популације (Benedict et al. 2009), услед губитка генетичког диверзитета и акумулације нових, штетних мутација и генетичких адаптација на „заточеништво“, а ове промене су штетне у природи у смислу квалитета отпуштених инсеката (Woodworth 2002). Дакле, укупни квалитет произведених адулта је под директним утицајем неведених процеса масовног узгоја и појава које из њих проистичу, и који могу ометати способност интеграције стерилисаних мужјака у природне популације и ефикасност конкуренције са дивљим мужјацима у процесу парења са дивљим женкама (Clarke and McKenzie 1992, Madakacherry et al 2014).

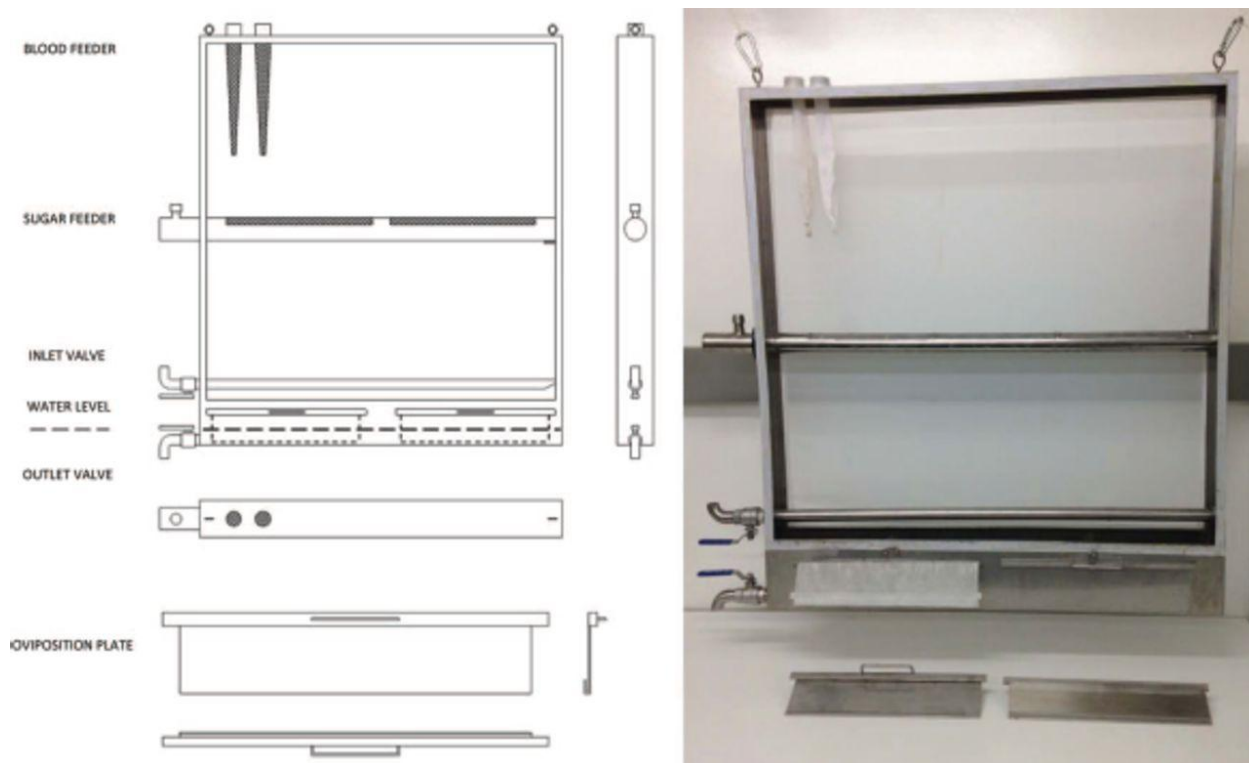
Део SIT-а који се односи на масовни узгој одређених инсекатских врста и који претходи стерилизацији и отпуштању у природу, је детаљно проучаван и односи се на могуће промене у понашању, морфологији, генетици, као и на испољавање утицаја тих промена на конкуритивност (конкурентност) отпуштених мужјака у односу на дивље сроднике

исте врсте. Истраживања у циљу побољшања ефикасности масовног узгоја комараца (што се последично одражава на квалитет и квантитет произведених инсеката) су од круцијалног значаја за SIT технику (Nunney 2002), нпр. одабир оптималних кавеза за узгој (IAEA 2010).

- Кавези за масовни узгој и испитивање компетитивности

Иако се у масовном узгоју комараца најчешће користе једноставни мали кавези (30x30x30 cm или 40x40x40 cm), у последње време се све чешће разматра увођење новог концепта употребе специјално дизајнираних кавеза, који би могли обезбедити већу продукцију инсеката, смањити и олакшати потребан рад омогућити да се све потребне операције (исхрана крвљу и шећерним раствором, сакупљање јаја, чишћење кавеза) могу обавити без потребе за манипулацијом унутар кавеза. Овакви кавези су већ развијени за *An. arabiensis*, *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* (IAEA 2014a), и већих су димензија од класичних кавеза, нпр. у случају *Ae. albopictus* димензије су: 100x10x100 cm (Сл. 32) (Balestrino et al. 2014a). Прелиминарни резултати сугеришу да је у случају масовног узгоја *Ae. albopictus* у овом типу кавеза, продукција јаја/женки била нижа него у класичном малом кавезу (IAEA 2014a).

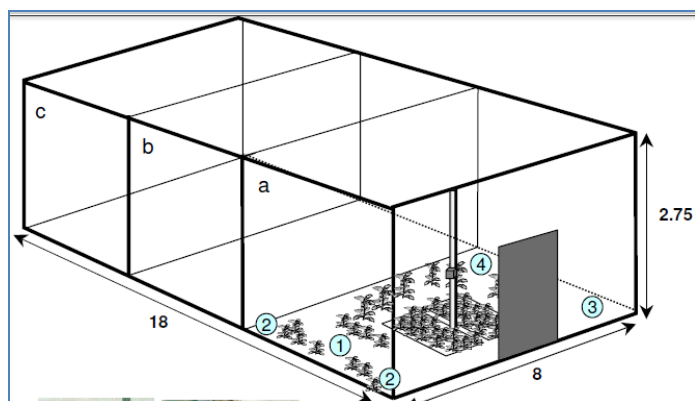
Величина кавеза у процесу масовног узгоја значајно утиче на дужину крила инсеката (што је морфолошка карактеристика која указује на виталност, величину тела и конкурентност у природним условима) и може значајно редуковати ефикасност стерилисаних мужјака када се пуне у природу (Nunney 2002). Осим тога, величина комараца може утицати на преживљавање, као и на фекондитет (Kelly and Edman 1992, Menge et al. 2005).



Сл. 32 Нови тип кавеза за масовни узгој *Ae. albopictus*: технички цртеж са погледом спреда, одозго и бочно (лево) и фотографија (десно). Приказани су уређаји за исхрану крвљу и шећерним раствором, интродукцију лутки („inlet valve“), и чишћење („outlet valve“). Такође су приказане металне плоче - опремљене филтер-хартијом за овипозицију. Осим тога, у кавезу постоји и филтер за сакупљање угинулих комараца и егзувија – али није приказан на овој слици. (Извор: Balestrino et al. 2014a)

Такође, величина кавеза игра велику улогу и у испољавању одређених перформанси мужјака. Нпр. у малим кавезима, при смањеној удаљености између индивидуа, стерилисани лабораторијски мужјаци су активнији од дивљих, док се у већим кавезима активност истих стерилисаних мужјака значајно смањује, а у великим кавезима постављеним у природи са вегетацијом (полу-природни услови), смањује се још више (Soemori et al. 1980; Miyatake and Haraguchi 1996; Robinson and Hendrichs 2005; Dyck et al. 2005). Поврх тога, при испитивању учинка парења веома је важно имати у виду да парење лабораторијских мужјака са лабораторијским женкама сличног генетичког наслеђа, може резултовати добром конкуренцијом лабораторијских мужјака у односу на дивље, али не мора значити да би се исти резултат добио и при парењу са дивљим женкама (Baker et al.

1979, Reisen 1980, Asman et al. 1983, Reisen 1983, Oliva et al. 2012a). Ово истиче значај оцењивања (провере) квалитета масовно узгојених инсеката одређивање конкуритивности лабораторијских мужјака са дивљим мужјацима, при процесу парења са дивљим женкама (Oliva et al. 2012a). Добри резултати се могу постићи и употребом система великих кавеза постављених у природу (Knols et al. 2002, Helinski et al. 2008, Robinson et al. 2009). Овакви кавези могу бити различитих димензија нпр. 1,75x1,75x1,75 m (Madakacherry et al. 2014); 6x3x2 m (Oliva et al. 2012a); 18 x 8 x 2,75 m подељени на три једнака сегмента (Сл. 33) (Helinski et al. 2008) и сл, а веома је важно да што боље симулирају природне услове. Путем прикупљања података односа стерилних и фертилних мужјака и нивоа стерилитета дивљих женки у оваквим кавезима, може се доћи до прецизне оцене конкуритивности мужјака. Ово омогућава идентификацију и евентуалну потребну модификацију одређених ставки протокола које имају највећи утицај на конкуритивност стерилисаних мужјака (у складу са евентуалним променама у масовном узгоју, транспорту или начину отпуштања) (Robinson et al. 2009).



Сл. 33 Шематски приказ изгледа кавеза у полу-природним условим, постављеног ради проучавања конкуритивности стерилисаних лабораторијских и фертилних дивљих мужјака *An. arabiensis* (цртеж - лево). Кавез је подељен у три једнака сегмента, при чему је сваки сегмент опскрбљен местима за одмор комарца (бројеви 1,2,3 и 4 – на шематском приказу), као и одговарајућом вегетацијом (фотографија -десно).

(Извор: Helinski et al. 2008)



### 2.7.2. Контрола квалитета

За праћење продуктивности и промена до којих може доћи током масовног узгоја инсеката, већина узгајалишта примењује тестове контроле квалитета (van Lenteren et al. 2003, Madakacherry et al. 2014), који су есенцијални за одржавање квалитета адулта, ефикасност узгоја, оптимизацију рада и трошкова (Carvalho et al. 2014). Они подразумевају честа мерења тежине лутки, способности парења и летења, дуговечности адулта, односа полова (одступање од „нормалног“ односа полова у колонији може бити рани показатељ проблема у узгоју), стопе и времена пиљења, стерилитета (FAO/IAEA/USDA 2003). Квалитет колоније такође може бити оцењен путем виталности релативног успеха јединке да пренесе своје гене у наредну генерацију (Massonnet-Brunel et al. 2013) - што је детаљније описано у Уводу ове докторске дисертације.

Осим тога, имајући у виду постојање нових генетички модификованих сојева комараца (лабораторијски креираних путем примене различитих технолошких платформи: класичне генетике, трансгенетике, генетичке употребе симбионата) и извесно повећање броја оваквих сојева у блиској будућности, потребно је развити и стандардне протоколе контроле квалитета оваквих сојева. Они би подразумевали компаративно оцењивање особина ових сојева компарацију параметара као што су: стопа развоја, величина јединки, конкурентност и капацитет парења, капацитет дисперзије, дуговечност. Овакви протоколи би имали две фазе: а) поређење квалитета мужјака у случају евалуације нових сојева и б) контролу квалитета мужјака током масовног узгоја и рутинских процедура. Тренутно не постоје стандарди за овакву евалуацију и поређење, али на њиховом развоју удружено раде FAO и IAEA (користећи сва постојећа знања и експертизу) (IAEA 2014a).

### 2.7.3. Начини сепарације полова

Један од највећих изазова током примене SIT програма у сузбијању комараца, је свакако раздвајање мужјака од женки. Ово је од изузетне важности, јер женке не само да боду и могу пренети проузроковаче болести, него се њихово евентуално отпуштање може негативно одразити и на број успешних парења стерилизованих мужјака са дивљим женкама (Myers et al. 1998). Такође, на успешност примене ИТ-а може утицати случајно отпуштање женки инфицираних некомпатибилним сојем *Wolbachia*-е (у оквиру

планираног отпуштања некомпатибилних мужјака - који треба да утичу на стерилизацију женки у природи), што може условити трајно настањење некомпатибилног соја *Wolbachia*-е у популацији, те проузроковати „замену“ популације, уместо њене елиминације (IAEA 2013). Услед наведених разлога, један од императива примене SIT програма јесте обезбеђивање високо прецизног система раздвајања полова, са циљем редукције бројности женки у узорку на минимум идеално би било да их уопште нема (IAEA 2014a). Прихватљива бројност резидуалних женки у узорку се разликује између земаља које су ендемске за одређене болести (где ова бројност треба да буде близу нуле) и земаља које нису ендемске за одређене болести (где прихватљива бројност може бити виша), али у сваком случају мора постојати довољан капацитет примењивих мера да би се сузбијање популације комараца одржавало испод епидемиолошког прага (IAEA 2014a).

Код родова *Culex* и *Aedes* се сепарација мужјака и женки базира на полном диморфизму тј. на различитој величини лутки (мужјаци су ситнији од женки) (Ansari et al. 1977), док се код рода *Anopheles* (маларични комарци) ова појава не испољава ( лутке мужјака и лутке женки имају знатно израженије преклапање величина), те се мора применити друга техника (Parathanos et al. 2009, Lees et al. 2015). Тако се некад адултима нпр. *An. albimanus* давао крвни оброк који садржи 0,5% малатиона што је убијало 95% женки, мада и значајан број мужјака (25%) услед контакта са контаминираном крвљу (Lowe et al. 1981, Alpheu et al. 2010, IAEA 2013).

У савременом раздвајању лутки мужјака и женки врста: *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti*, и *Cx. quinquefasciatus* најчешће се користи механички систем, и то тзв. техника „просејавања“ базирана на полном диморфизму лутки и употреби специјалног сита са квадратном мрежом, чије перфорације (окца) омогућавају пролазак само најситнијих лутки (које би по правилу требало да буду мужјаци, али је ипак резидуално присуство женки у узорку око 1%) (IAEA 2013), мада се дешава да тај проценат буде и виши. Код врсте *Ae. albopictus* овај систем омогућава коришћење свега 20-29% укупне популације узгојених мужјака, што има неповољан утицај на продуктивност масовног узгоја и повећање трошкова (IAEA 2014a, Bellini et al. 2013a). У случају да је неопходно додатно минимизовати присуство женки у узорку, поменути низак проценат издвојених мужјака би се последично још смањио (IAEA 2014a). Осим система раздвајања полова који се

заснива на полном диморфизму лутки, механичка сепарација полова комараца може бити базирана и на различитој брзини развоја мужјака и женки протандрији (особина комараца да се мужјаци комараца развијају брже од женки). Да би била способна да се улутка, ларва комараца мора достићи критичну масу, која је виша код женки – што води њиховом дужем периоду развоја (Chambers and Klowden 1990). У складу са тим, ларве мужјака почињу са улуткавањем пре ларви женки, тако да су лутке које буду сакупљене током прва 24 сата од почетка улуткавања већином мужјаци (Balestrino et al. 2014b). На протандрију утиче више фактора, нпр. температура током гајења, густина ларви и исхрана. Ова особина је нарочито коришћена при сепарацији полова рода *Aedes* (*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Ae. polynesiensis*) (IAEA 2013) и може се комбиновати са механичким раздвајањем путем сита (што ће бити приказано у Огледу II ове докторске дисертације).

Када је у питању род *Anopheles*, тренутно се за раздвајање полова у узорку примењује техника храњења одраслих женки крвним оброком који садржи ивермектин (ivermectin) (IAEA 2014a). Ивермектин је макроциклични лактонски екстракт бактерије *Streptomyces avermitilis* који инхибира неуролошку трансмисију код бескичмењака, те утиче на њихов нервни систем и функцију мишића (Yates and Wolstenholme 2004, Yamada et al. 2013). Утврђено је да додавање овог биоцида у крвни оброк женки *An. arabiensis*, у концентрацији од 7,5 ppm током 4 дана, условљава њихову потпуну елиминацију. Тачније, орални унос ивермектина је условио угинуће женки за максимално 12 часова, али је било потребно 4 дана да све женке узму крвни оброк. Осим тога, констатовано је да претходно извршен третман ирадијацијом (целокупног узорка лутки оба пола) није утицао на навике у исхрани женки, нити су стерилисани мужјаци (који су имали слободан приступ хранилицима са крвљу третираном ивермектином) били мање компетитивни у односу на стерилисане мужјаке који нису били у овом окружењу. Такође, забележен је низак морталитет мужјака у кавезима са ивермектином, а пошто је преживљавање мужјака један од приоритета SIT-а, важно је да се у сврхе раздвајања полова користе искључиво материје које имају високу оралну, а ниску контактну токсичност (Yamada et al. 2013). Ипак, без обзира на квалитет ове технике, мана је што су мужјаци присутни у кавезу са женкама неколико дана, тако да може доћи до парења, смањења залиха сперме стерилисаних мужјака (који нису у стању да их надокнаде), што би могло редуковати

њихову ефикасност у инсеминацији дивљих женки, након што буду отпуштени у природу, и негативно се одразити на ефикасност SIT-а (Yamada et al. 2013).

Основни недостаци описаних техника код родова *Aedes* и *Culex* су контаминација женкама, коришћење малог броја укупно произведених лутки мужјака, те селекција најситнијих мужјака из узорка (у случају механичке сепарације полова путем употребе сита). Код рода *Anopheles* може доћи до смањења залиха сперме стерилисаних мужјака у случају примене ивермектина у крвном оброку. Због наведеног се јавила потреба за ефикаснијим начинима сепарације полова. То су нпр. генетички индукован сексуални диморфизам (Alphey et al. 2010); или још ефикасније генетичко раздвајање полова (GSMs – genetic sexing mechanisms), где се као један од бољих приступа показао RIDL принцип, помоћу кога може да се индукује леталност специфична само за женке, тако да оне могу бити одстрањене из укупног узорка (Thomas et al. 2000). Генетички креиран летални фенотип женки ће угинути ако им се током периода развоја ларви не обезбеди тетрациклин (или адекватан хемијски аналог) (Thomas et al. 2000, Fu et al. 2007), што обезбеђује уклањање свих женки из узорка. Овакви сојеви комарца су већ креирани за *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* (Alphey et al. 2010). Ипак, да би се користили генетички моификовани сојеви комарца – потребно је прибављање специјалних дозвола и одобрења од стране државе, што не резултује увек успехом (тако да је употреба оваквих сојева још увек ограничена на веома мали број земаља).

Када је у питању род *Anopheles*, један од новијих приступа у раздвајању полова се односи на усавршавање примене произведене трансгенетичке линије врсте *An. stephensi* која продукује флуоросцентне ембрионе. Овај флуоросцентни сигнал је довољно јак да пробије тамни хорион јајета, те се стога лако уочава, и треба да буде карактеристичан за пол. Још једна од планираних техника сепарације полова заснива се на компјутерским посматрању и анализирању величине лутки, када би се на основу разлике у броју пиксела могле аутоматски разликовати лутке мужјака и лутке женки. Након тога би следила елиминација лутки женки путем употребе ласерских зрака велике брзине и тачности (IAEA 2013).

#### 2.7.4. Стерилизација

За ирадијацију инсеката се обично користи гама зрачење због његове високе енергије и пенетрације. Најчешћи извори гама зрачења су радиоизотопи  $^{60}\text{Co}$  и  $^{137}\text{Cs}$  који имају дуг период полураспада и емитују високоенергетско гама зрачење. Осим гама зрачења, у ове сврхе такође може бити коришћено и X - зрачење (Сл. 34), као и акселератор електронског снопа. Радиоизотоп  $^{60}\text{Co}$  се лакше производи, те се због тога и чешће користи. Класична комора за ирадијацију је окружена са неколико цеви овог изотопа (Сл. 35). Према међународном систему јединица (SI систем – International System of Units), мерна јединица апсорбоване дозе зрачења је Греј (ознака Gy) и дефинише се као апсорпција једног Џула (ознака J) енергије радијације у једном килограму материје. Степен ирадијације (озрачивања) ћелије се одређује активношћу извора, а доза која се „испоручује“ инсектима (апсорбовна доза) се контролише подешавањем времена излагања. Дистрибуција дозе зрачења није иста у целој комори, стога инсекти могу примити различите дозе зрачења у зависности од тога на које позиције бивају постављени у комори. Најуниформнија доза је у центру коморе (Helinski et al. 2009).



Сл. 34 Прототип машине са X зрацима



Сл. 35 Ирадијатор  $^{60}\text{Co}$

(Извор за обе фотографије: <http://www.malariajournal.com>)

Када се озрачује биолошки материјал, кидају се везе између молекула, настају јони и формирају се слободни радикали. Слободни радикали надаље кидају везе између

молекула, и када је DNA оштећена - то може довести до доминантних леталних мутација (које су резултат оштећења хромозома) у герминалним ћелијама (LaChance 1967, Helinski et al. 2009). Предност ирадијације је то што ће у случају озрачивања мужјака велика већина сперматозоида носити више од једне доминантно леталне мутације, при чему је свака од њих другачија, што практично онемогућава да популација у природи развије неку врсту резистентности (Robinson et al. 2009), мада се теоријски спомиње могућност развоја посебних механизма понашања дивљих женки, који би могли спречити њихово парење са стерилним мужјацима (Barclay 1996) у случају да они почну да демонстрирају карактеристике удварања које се разликују од карактеристика дивљих мужјака (Duck et al. 2005).

Сперматогенеза код мужјака комараца почиње углавном током стадијума ларве и лутке. Тачан моменат почетка овог процеса зависи од врсте комараца, што значи да се и процентуални удео сперматиде и зрелих сперматозоида (у односу на остале развојне стадијуме) у тестима лутке - током њених последњих часова пред излетање (када се обично врши озрачивање) разликује код различитих врста (Clements 1992, Helinski et al. 2009). Током сукцесивних стадијума сперматогенезе, герминалне ћелије (смештене у гермаријуму тј. вршном делу фоликула тестиса) се умножавају и диференцирају, што подразумева следеће стадијуме развоја: примордијалне герминалне ћелије, сперматогоније (примарне и секундарне), сперматоците (примарне и секундарне), сперматиде и сперматозоиде. Сперматогенеза је цистична, и у оквиру једног тестиса се могу наћи сперматоците у различитим фазама развоја. Како сперматоците сазревају, почињу да пуцају, те отпуштају сперматозоиде у резервоар сперме (*vesicula seminalis*). Генерално, ранији стадијуми сперматогенезе (сперматогоније и сперматоците) су осетљивији на ирадијацију од каснијих стадијума (сперматиде и сперматозоиди), у смислу неповратних оштећења. Ирадијација може узроковати смрт сперматогонија и сперматоцита, прекидање њиховог процеса сперматогенезе (Anwar et al. 1971, Proverbs 1969, Bakri et al. 2005, Helinski et al. 2009). С друге стране, утицај ирадијације на касније развојне стадијуме сперматогенезе (тј. сперматиде и сперматозоиде, који су већ били формиран у инсекту који се озрачује), манифестује се доминантно леталним мутацијама сперматозоида, које узрокују смрт ембриона након оплодње (Helinski et al. 2009).

Управо ове појаве могу бити разлог што озрачени мужјаци, након што су потпуно оплодили неколико женки (тачније 7 - у случају *Ae. aegypti*), нису у стању да, попут неозрачених мужјака, довољно обнове своје залихе сперме да би наставили са даљим потпуним инсеминацијама (што на крају процеса трансфера сперме подразумева напуњену најмање једну сперматеку) него су у могућности да изврше једино парцијалне инсеминације (када је напуњена само *bursa copulatrix*). Неозрачени мужјаци *Ae. aegypti* могу, пак, потпуно оплодили чак 11 женки, пре него што су почну са парцијалним инсеминацијама (Oliva et al. 2013). Резултат ових огледа је у складу са чињеницом да стерилисани мужјаци у старту имају мање залихе сперме у тестисима, те их брже исцрпљују, а имају и мању могућност да их надокнаде током адултног стадијума, јер је велики део сперматогонија и сперматоцита неповратно оштећен током стерилизације.

Такође, оштећења изазвана ирадијацијом се појављују и на соматским ћелијама, нарочито током митозе. Генерално, са повећањем дозе зрачења повећавају се и оштећења у полним и соматским ћелијама, мада се ниво соматских оштећења смањује у случају ирадијације у каснијем периоду развоја инсеката, пошто се смањује и број ћелија које се деле (Helinski et al. 2009). Соматска оштећења се обично испољавају кроз редукцију дуговечности, смањену сексуалну моћ и генерално смањену активност мужјака (Proverbs 1969, Oliva et al. 2012a).

Да би се редуковала соматска оштећења, инсекти треба да буду озрачени у што каснијем периоду свог развоја тј. у касном стадијуму лутке или у стадијуму одраслог. Примећено је да су мужјаци који су били озрачени у стадијуму лутке имали мању конкуритивност у односу на мужјаке који су озрачени у стадијуму одраслог. Међутим, ипак се препоручује стерилизација у стадијуму лутке због знатно једноставнијег руковања и њихове мање остелјивости (у односу на адулте) при различитим манипулацијама током процеса припреме SIT апликације (Helinski et al. 2009). Такође, старост лутки мужјака у тренутку озрачивања је важан фактор који утиче на дуговечност будуће одрасле јединке (што су лутке старије – то боље, јер су и соматска оштећења услед ирадијације мања). Тако се показало да ирадијација лутки мужјака *Ae. albopictus* старијих од 30 часова, није имала утицај на дуговечност одраслих, до дозе зрачења од 40 Gy (која индукује ниво стерилитета >99%) (Balestrino et al. 2010). Када је у питању негативан утицај радијације на трајање парења и број потпуних парења по мужјаку, Balestrino et al. (2010) су утврдили да такав

утицај код *Ae. albopictus* постоји једино у случају доза виших од 40 Gy; док су Oliva et al. (2012b) показали да ирадијација *Ae. albopictus* при дози од 35 Gy може делимично инхибирати продукцију сперме након излетања мужјака, резултујући мањим бројем успешних инсеминација стерилисаних мужјака у односу на фертилне те стога могу утицати на смањење укупне ефективности парења. Дакле, иако негативни ефекти стерилизације мужјака на дуговечност и капацитет парења могу бити минимизовани путем прилагођавања старости јединки у тренутку озрачивања, дозе и времена излагања радијацији (Andreasen and Curtis 2005, Paker and Mehta 2007, Balestrino et al. 2010), она ипак може бити штетна по отпуштене мужјаке (Patterson et al. 1977, Helinski et al. 2006, Madakacherry et al. 2014) и негативно се одразити на њихову конкуритивност након отпуштања.

Једна од стратегија за неутралисање смањења способности парења је отпуштање великог броја стерилисаних мужјака, који ће знатно надмашити бројност дивљих мужјака у природи што се манифестује кроз тзв. „overflowing ratio“ - однос преплављености популације стерилисаним мужјацима, те ће услед тога стерилисани мужјаци ипак моћи да утичу на смањење фертилитета дивље популације (иако су појединачно мање конкуритивни). Али, мада се ова стратегија чини једноставном, трошкови тако огромне продукције мужјака су веома високи, те мора бити утврђен оптималан број мужјака који треба да буду произведени, стерилисани и отпуштени уз најниже могуће трошкове (Madakacherry et al. 2014). Из ових разлога се предлаже, без обзира на генерално уверење да отпуштени мужјаци треба да буду стерилни у потпуности, да се боља ефикасност индукције стерилитета у природу постигне употребом нижих доза зрачења, што би омогућило таквим инсектима вишу конкуритивност (Helinski et al. 2009). Но, без обзира што постизање 100% стерилитета може бити контрапродуктивно у случају да резултује знатним смањењем конкуритивности мужјака (Kaiser et al. 1978), приликом стерилизације комараца треба применити дозу која обезбеђује најмање 95% стерилитета и не треба ићи испод овог процента (IAEA 2014a).

Такође, треба обратити пажњу да се доза зрачења потребна за индукцију одеђеног степена стерилитета мужјака - разликује код различитих врста комараца, те је тако за потпуну стерилизацију врста *Anopheles arabiensis* потребно употребити дозу од чак 100 Gy (IAEA 2014a), док се постизање скоро потпуног стерилитета (>99%) *Ae. albopictus* постиже већ



при дози радијације од 40 Gy, а потпуног при дози >60 Gy (Balestrino et al. 2010). Осим тога, утврђено је да су лутке женки много осетљивије на радијацију од лутки мужјака, са јаком редукцијом фекондитета и фертилитета већ на 20 Gy (код *Ae. albopictus*), док до потискивања овипозиције долази при вишим дозама (Balestrino et al. 2010). Ово сазанање је изузетно важно у случају нежељеног отпуштања женки у природу (јер иако су способне да боду и преносе проузроковаче болести, такве женке нису способне да оставе потомство).

Кључни захтев за успешан SIT програм је индукција генетичког стерилитета у женке природне популације одређене инсекатске врсте. Дакле, стерилисан мужјак треба да се пари и пренесе вијабилу сперму и продукте додатних жлезда ( пепридне матроне које дестимулишу спарену женку да се поново пари са другим мужјаком) одговарајућег квалитета и квантитета, што ће осигурати адекватно понашање женке. Ово значи да је дефиниција стерилног мужјака, у смислу примене SIT-а код комараца веома уског значења и не подразумева да су мужјаци без сперме (аспермични); или да не могу да пренесу вијабилну сперму; или да не осигувавају исправан образац понашања женке; или да на било који други начин не успевају да „убеде“ женку да је спарена са „нормалним“ мужјаком. Дакле, стерилисан мужјак је једноставно носилац генетички компромитоване (промењене) сперме (Robinson et al. 2009).

Иирадијација индукује велику групу различитих доминантних леталних мутација у стерилисаној сперми, и што је доза радијације виша, већа је и вероватноћа да ће сваки сперматозоид носити барем једну доминантно леталну мутацију. Али, иако након стерилизације одговарајућом дозом сваки сперматозоид носи доминантни летални ген, увек постоји могућност, ма колико мала била, да ће неко јаје бити фертилно и да ће доћи до пиљења ларве (Robinson et al. 2009).

Стерилитет индукован у дивљим женкама је производ доминантно леталних мутација индукованих у сперми отпуштених мужјака (односно индукованог стерилитета мужјака) и компетитивности тих мужјака у природи (Robinson et al. 2009). Као што је већ споменуто, постизање потпуног стерилитета путем јако високих доза радијације на уштрб смањења компетитивности није најбоља стратегија (Parker and Mehta 2007, Robinson et al. 2009). Bellini et al. (2013b) су у серији огледа у полу-природним условима доказали да се редуковање дозе ирадијације са 60 Gy на 40 Gy и 30 Gy (редукција стерилитета мужјака)

може превазићи повећаном конкуритивношћу таквих мужјака. Fried Index (индекс конкуритивности мужјака) је при примени дозе од 30 Gy износио чак  $1,00 \pm 0,66$  – што указује на готово једнаку конкуритивност стерилисаних и фертилних мужјака, док је Fried Index у случају дозе од 40 Gy био нижи:  $0,72 \pm 0,36$  (стерилисани мужјаци су били слабије конкуритивни од фертилних). Дакле, без обзира што је доза радијације од 30 Gy условила свега 95,63% стерилитета мужјака док је доза од 40 Gy условила чак 99,18% стерилитета мужјака, индекс капацитета за индуковање стерилитета у популацију - CIS Index (Capacity to Induce Sterility Index) је при примени дозе од 30 Gy био виши (0,96), него при примени дозе од 40 Gy (0,71). Ово указује на то да доза ирадијације од 30 Gy може чак представљати бољи компромис између потребе индукције стерилитета и одржавања високог нивоа конкуритивности (Bellini et al. 2013b).

## **2.7.5. Последице стерилизације на мужјаке и њихову ефикасност**

### **- Радијацијски-индуковано превремено излетање и полно сазревање**

Феномен радијацијски-индукованог превременог сазревања мужјака комараца, констатован је код врсте *Ae. albopictus* и подразумева спремност стерилисаних мужјака да почну са парењем неколико часова пре нестерилисаних, што им обезбеђује временску предност у конкуренцији са фертилним мужјацима за парење са женкама (Bellini et al. 2013b, Oliva et al. 2012a). Ова појава је уочена и код других инсеката нпр. код *Glossina* spp. (Curtis 1970 in Bellini et al. 2013b). Поменути феномен је веома важно имати у виду приликом извођења огледа у којима се мери конкуритивност мужјака (нпр. у великим кавезима у полу-природним условима), јер тада треба интродуковати женке неколико дана након интродукције мужјака - да бисмо били сигурни да су сви мужјаци излетели (тј. прешли из стадијума лутке у адулта) и имали довољно времена да постану спремни за парење.

Радијацијски-индуковано превремено излетање и полно сазревање мужјака врсте *Ae. albopictus* проучавано је од стране неколико групе аутора. Тако су Bellini et al. (2013b) констатовали да су мужјаци из озрачених лутки *Ae. albopictus* (60 Gy) почели да излећу истовремено са неозраченим, али је трајање периода потребног за излетање свих озрачених мужјака било значајно краће него код неозрачених мужјака. Након излетања,

мужјаци комарца нису одмах способни за парење, него им је потребан изврстан период да би се завршила сексуална матурација (односно полно сазревање), која код мужјака комараца подразумева ротацију гениталија (односно ротацију терминалних сегмената) за 180° (Oliva et al. 2011). Поређење трајања овог процеса код стерилисаних и фертилних мужјака *Ae. albopictus* истраживали су Oliva et al. (2012a) и утврдили да ротација терминалних сегмената стерилисаних мужјака (35 Gy) почиње најраније 3 сата након излетања, што је значајно раније него код фертилних мужјака (4 сата након излетања), да би у року од 10 часова по излетању, сви мужјаци почели са ротацијом, мада је она била неједнаке брзине (и код стерилисаних, и код фертилних мужјака). Први стерилисани мужјаци који су потпуно завршили са ротацијом уочени су након 13 часова (11% мужјака), док су је сви остали завршили у року од 20 часова. Код фертилних мужјака ситуација је била другачија. Иако је 25% фертилних мужјака завршило ротацију већ након 11 сати, да би сви потпуно завршили ротацију било је потребно 25 сати (што је чак 5 часова дуже него у случају стерилисаних мужјака).

#### - Резидуални фертилитет и опоравак фертилитета

Степен и постојаност стерилитета мужјака након ирадијације су особине које је веома важно утврдити приликом оптимизације дозе радијације и примене SIT-а. Примећено је да код стерилисаних мужјака након одређеног времена може доћи до опоравка фертилитета у различитом степену или стерилитет није у потпуности ни био постигнут – тзв. резидуални фертилитет (што зависи од примењене дозе радијације), а ове појаве утичу на степен стерилитета циљне популације. Резидуални фертилитет и степен опоравка фертилитета стерилисаних мужјака током времена се најбоље оцењују путем евидентирања промена у проценту пиљења јаја положених од стране женки са којима су се парили.

Резидуални фертилитет стерилисаних мужјака *Ae. albopictus* старих 3-4 дана, констатован у полу-природним условима (у великим кавезима тзв. „тунелима“) при дози радијације од 40 Gy (Bellini et al. 2013b) је био веома сличан вредностима утврђеним у лабораторијским условима при истој дози радијације, и кретао се у интервалу од 0,4% до 0,8% (Balestrino et al. 2010). Bellini et al. (2013b) су у својим огледима у полу-природним условима отишли и корак даље, те су након утврђивања резидуалног фертилитета стерилисаних мужјака

старих 3-4 дана, из поменутих тунела аспирирали све иницијално интродуковане женке; да би потом потом у њих интродуковали нове неспарене женке у циљу парења са 11 дана старим мужјацима. Засебно су се тестирале две дозе зрачења (30 Gy и 40 Gy). Опоравак фертилитета код мужјака озрачених са 30 Gy је био двоструко виши када су у питању били мужјаци стари 11 дана (8,64%), у односу на резидуални фертилитет мужјака старих 3-4 дана (4,37%). У случају мужјака озрачених са 40 Gy, резидуални фертилитет након 3-4 дана је био свега 0,82%, да би код мужјака старих 11 дана био скоро шест пута виши - износио је 4,93%. Мада, услед великих варијација података нису регистроване статистички значајне разлике (Bellini et al. 2013b).

Олакшавајућа околност за констатовану непожељну особину опоравка фертилитета стерилисаних мужјака *Ae. albopictus* (30 Gy и 40 Gy) евидентирану након 11. дана живота (Bellini et al. 2013b), може бити чињеница да стерилисани мужјаци (35 Gy) после 9. дана живота имају 50% нижи учинак парења од фертилних мужјака *Ae. albopictus* (Oliva et al. 2012b). Ова појава теоријски снижава могућност полагања извесног броја фертилних јаја од стране женки спарених са стерилисаним мужјацима код којих је почео опоравак. Такође, према налазима Oliva et al. (2012b) ефикасност парења стерилних мужјака се не мења значајно током прве недеље након излетања; када опоравак фертилитета вероватно није још увек јако изражен (као нпр. после 11. дана), мада би свакако требало испитати брзину овог опоравка (пратећи је свакодневно), као и њену евентуалну корелацију са дозом ирадијације.

#### - Нижи учинак парења

Ова појава се заснива на чињеници да стерилисани мужјаци *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* нису способни да допуне своје „залихе“ сперме (sperm stock) ако су их потрошили (што се утврђује путем дисекције женки са којима су се парили и констатовања броја сперматека напуњених спермом) (Oliva et al. 2013), док нетретирани (фертилни) мужјаци могу успешно производити нову сперму, нарочито ако су имали периоде одмарања (односно периоде без сексуалне активности) између узастопних парења (Jones 1973, Dapples et al. 1974, Mahmood and Reisen 1982, Ponlawat and Harrington 2009, Oliva et al. 2013). Дакле, иако се копулација женки са стерилним мужјацима не разликује од копулације са фертилним мужјацима у трајању и приближној количини пренешене сперме (Oliva et al.

2013) током првих недељу дана (Oliva et al. 2012b), након тог периода долази до редукције успешних узастопних парења стерилисаних мужјака у односу на фертилне, услед смањења количине сперме (Oliva et al. 2013).

#### **2.7.6. Мерење стерилитета у дивљој популацији**

Веома важан параметар у вези са отпуштањем стерилисаних мужјака је мерење стерилитета у дивљој популацији, јер је индуковани стерилитет у дивљим женкама заправо веза између отпуштених стерилисаних мужјака и редукције величине популације. Такође се, путем података о односу стерилних и фертилних мужјака и нивоу стерилитета дивљих женки, може доћи и до прецизне оцене компетитивности мужјака (Robinson et al. 2009).

Оцена стерилитета може бити измерена директно – нпр. у случају када је изводљиво лако хватање живих женки, те одношење у лабораторију где би им се омогућила исхрана крвљу, полагање јаја, да би се на крају оценила стопа пиљења јаја (Robinson et al. 2009); или путем постављања овипозиционих клопки у природи – те утврђивањем стопе пиљења јаја у лабораторији, као што је већ рађено на *Ae. albopictus* (Bellini et al. 2013a). Алтернативна метода подразумева обележавање отпуштених мужјака агенсом који је инкорпориран у секреције додатних жлезда, те ће стога бити преношен током парења, у количини чије се присуство може уочити у дисекованим сперматекама дивљих женки (Robinson et al. 2009). Овакво обележавање се може вршити помоћу стабилних изотопа (Helinski et al. 2007), или путем трансгенетички инкорпорираних флуоресцентних протеина (Catteruccia et al. 2005).

У случају примене SIT-а у сузбијању врсте *Ae. albopictus*, ефикасност стерилисаних мужјака у индуковању стерилитета у дивљу популацију може бити оцењена путем: 1) процене броја јаја у овипозиционим клопкама; 2) смањења броја јаја у SIT подручју, у односу на контролну област; и 3) израчунавањем процента стерилитета јаја сакупљених у овипозиционим клопкама SIT подручја у односу на контролну област (Carrieri et al. 2011b, Bellini et al. 2013a). Ипак, пре примене SIT-а у природи, потребно је у полу-природним условима проценити капацитет за индуковање стерилитета (CIS Index).

Индекс капацитета за индуковање стерилитета - CIS Index (Capacity to Induce Sterility Index) омогућава свеобухватну процену реалног капацитета да се индукује стерилитет у популацији (Bellini et al. 2013b), и израчунава се помоћу формуле која пореди бројност стерилних и фертилних мужјака и проценат пиљења јаја (Материјал и метод рада, Оглед II). Мерење процента пиљења јаја даје индикацију индукованог стерилитета, и подразумева прегледање овипозиционих клопки (Alphey et al. 2010).

### **2.7.7. Компетитивност и Fried's Competitiveness Index**

Компетитивност мужјака је степен до кога су стерилисани мужјаци у могућности да се паре са дивљим женкама у природи, у поређењу са дивљим мужјацима, како би женке биле онемогућене да положи вијабилна јаја (IAEA 2010). Успех или неуспех SIT програма је, дакле, директно повезан са могућношћу отпуштања стерилисаних мужјака, који би ефикасно оплодили дивље женке спермом која је стерилна (IAEA 2005). Могућност стерилисаног мужјака да се такмичи са дивљим мужјаком (Сл. 36) је у функцији његовог фенотипа, који је (као и код свих живих организама) одређен експресијом његовог генотипа у животној средини (Dyck et al. 2005). Услови у постројењима за масовни узгој се веома разликују од природних, што може утицати на фенотип стерилисаних инсеката како директно, тако и путем селекције генетичких разлика између гајених и дивљих популација. Пажљиво праћење фенотипа (односно квалитета стерилисаног инсекта) је кључна компонента успешности SIT програма (Dyck et al. 2005). Квалитет стерилисаног инсекта односно његова компетитивност при парењу може бити под утицајем два типа проблема: 1) могуће редукције виталности (животне снаге односно фитнеса) услед гајења у вештачким условима и 2) редукције способности парења мужјака услед излагања радијацији која може узроковати соматска оштећења (Bellini et al. 2010).



Сл. 36 Приказ конкуренције 2 мужјака *Ae. albopictus* за парење са женком  
(Извор: <http://www-naweb.iaea.org>)



Сл.37 Мужјаци комараца се хране слатким течностима (из различитих извора)  
(Извор: <http://bugguide.net>)

Да би се повисила конкуритивност стерилисаних мужјака чине се многи напори, који подразумевају огледе у циљу усавршавања и стандардизације услова масовног узгоја, прилагођавања дозе стерилизације (о чему је већ било речи), као и начина отпуштања. Тако је утврђено да се употреба различитих врста хране током узгоја комараца (током стадијума ларве и/или адулта пре отпуштања у природу), може одразити на различите начине на њихову способност конкуренције са дивљим мужјацима (IAEA 2010, Puggioli et al. 2013, Bellini et al. 2014).

Код комараца постоје дефинисане потребе за количинама липида, гликогена и протеина, и минималне количине одређују линију између живота и смрти. Овај ниво такође зависи и од величине тела, а дужина живота је логаритмично повезана са логаритмом концентрације шећера у храни. Потребну енергију адулти комараца обезбеђују путем исхране угљеним хидратима (најчешће је то глукоза) чији извори могу бити цветни нектар (Сл.37), течност из трулих плодова, медна роса и друге слатке течности, с тим да је женкама потребна и исхрана крвљу (да би могле формирати јаја) (Briegel et al. 2001). Дакле, за мужјаке

комараца једини начин прибављања енергије представља конзумирање шећерног оброка, а његови различити извори могу условити различите стопе преживљавања и способности парења комараца у природи. Истраживања су показала да су чести шећерни оброци и њихов квалитет (који зависи од извора шећера) значајно повезани са репродуктивним успехом мужјака (његовом виталношћу, способношћу летења и дуговечношћу). Осим тога, остали нутриенти, као што су бактерије или аминокиселине присутне у медној роси биљних ваши, могу допринети репродуктивном успеху мужјака путем подстицања сперматогенезе, као и инкорпорацијом у протеине додатних жлезда. Продубљивање оваквих информација допринеће успеху SIT програма путем формулисања оптималне исхране мужјака пре отпуштања у природу, што би се позитивно одразило на њихову конкуритивност. Такође, када се у природи идентификују преовлађујући извори нутритивната, технике отпуштања могу бити прилагођене (просторно и временски) у циљу оптимизације учинка мужјака (IAEA 2010).

Квалитет произведених мужјака је захтеван за оцењивање и подразумева мерење величине и масе лутки и адулта, и утврђивање њиховог биохемијског састава (нпр. протеина, липида и резерви угљених хидрата односно гликогена), али и оцену њихове конкуритивности (односно поређења учинка парења) у лабораторијским кавезима, затим у великим кавезима у природи (односно у полу-природним условима), те на послетку и у природним условима (Alpheu et al. 2010, O'Connor et al. 2012). Оваква истраживања се спроводе пре примене планираног SIT програма (са циљем сузбијања или елиминације популација), а њихово правилно извођење подразумева примену стандардизованог приступа и обезбеђивање услова који подстичу „природно“ понашање комараца током парења (IAEA 2010).

Конкуритивност мужјака може бити оцењена путем израчунавања тзв. Fried Index-а (FI) (Fried 1971, Hooper and Katiyar 1971, Bellini et al. 2013b, Yamada et al. 2014). Вредност Fried Index-а око 1 указује на једнаку конкуритивност стерилисаних и фертилних мужјака (FAO/IAEA/USDA 2003),  $FI < 1$  означава да су стерилисани мужјаци слабије конкуритивни у односу на фертилне, док  $FI > 1$  значи да су стерилисани мужјаци конкуритивнији од фертилних (Shelly et al. 2007). Тако нпр. вредност  $FI = 0,53$  сугерише да су стерилисани



мужјаци двоструко слабије копетитивни у односу на фертилне (Maïga et al. 2014).  
Формула за израчунавање FI, приказана је у поглављу: Материјал и метод рада, Оглед II.

### **2.7.8. Отпуштање стерилисаних мужјака у природу**

#### - Однос отпуштених стерилисаних и дивљих мужјака

Код многих врста инсеката код којих се примењује SIT, бројност отпуштених мужјака значајно треба да премаши бројност дивљих мужјака, због обично ниже копетитивности стерилисаних мужјака. Тако је нпр. приликом огледа у природним условима са *Glossina palpalis gambiensis* (у Буркини Фасо) израчунато да би за индуковање потпуног стерилитета женки дивље популације однос броја отпуштених стерилисаних мужјака у односу на дивље требало да буде најмање 14:1 (Sow et al. 2012). Када је у питању *Ceratitits capitata* (у Гватемали) значајна индукција стерилитета женки дивље популације (од око 70%) није констатована све док однос броја стерилних и дивљих мужјака није досегао 100:1 (Rendon et al. 2004), док је у случају примене SIT-а код *Cydia pomonella* (у Британској Колумбији, Канада) овај однос износио 40:1 (Bloem and Bloem 2000). Код поменутих врста инсеката је однос стерилних и дивљих мужјака израчунат на основу огледа у природи, док је код комараца ова процедура била постепенија и дуго се заснивала на прикупљању великог броја лабораторијских података (Madakacherry et al. 2014) и напорима да се дефинише оптималан однос отпуштања у складу са трошковима и ефикасношћу извођења SIT програма (Patterson et al. 1970, Patterson et al. 1977, Reisen et al. 1982). Тек су Harris et al. (2012) приликом недавних огледа у природи са RIDL сојем *Ae. aegypti* (на Кајманским Острвима) и O'Connor et al (2012) током огледа са *Ae. polynesiensis* инфицираним *Wolbachia*-ом из *Ae. riversi* (ИТ оглед) обезбедили иницијалне податке о таквом односу отпуштања код врста рода *Aedes*.

Када би отпуштени мужјаци комараца били једнако копетитивни у односу на дивље мужјаке и потпуно стерилни, тада би било потребно отпустити најмање 10 пута више стерилисаних мужјака у односу на бројност мужјака из дивље популације (Robinson et al. 2009, Harris et al. 2012, O'Connor et al. 2012). Међутим, пошто се једнака кометитивност готово никад не може достићи, овај однос би у реалности морао бити виши да би се достигло адекватно смањење бројности популације (Robinson et al. 2009), нпр. ако је

компетитивност 0,5 потребно је отпустити дупло више мужјака него кад је компетитивност 1,0 (Dame et al. 2009). Редукција популације у пракси такође зависи и од учесталости и дистрибуције отпуштања; ефекта технике отпуштања на компетитивност; дуговечности отпуштених мужјака и њихове способности да се шире и нађу женке; дистрибуције дивље популације и губитака услед предатора (Dame et al. 2009). Ови параметри нису лаки за мерење и често долази до раскорака између оцене компетитивности и процењених потреба односа отпуштања. Тако су нпр. Patterson et al. (1977) оценили да је ниво компетитивности мужјака *Culex quinquefasciatus* у кавезу 0,75, да би након отпуштања стерилисаних мужјака у природне услове ниво компетитивности био оцењен са 0,25-0,33. Ово је индикација да је заправо било потребно отпустити 3-4 стерилисана мужјака а не 1,3 стерилисана мужјака – што је било процењено на основу израчунате компетитивности у кавезу. Осим тога, да би се достигао ефективан однос од 10:1 (у овим условима) однос отпуштања би требало да буде најмање 30:1 (Dame et al. 2009).

Према Alrhey et al. (2010) однос отпуштања комараца треба да буде одређен за сваку врсту понаособ, али такође треба имати у виду да се у узорку стерилисаних мужјака увек нађе и одређен број женки - обично око 0,1-1%, мада може бити и више (осим у случају генетичког раздвајања полова, када је прецизност 100%), те и њихов број треба узети у обзир приликом израчунавања односа отпуштања.

- Учесталост отпуштања стерилисаних мужјака, дуговечност и стопа дневног преживљавања

Број отпуштених стерилисаних мужјака и учесталост њиховог отпуштања у датим условима треба да буду пажљиво одређени, у складу са њиховом компетитивношћу, просечном дуговечношћу и стопом преживљавања, да би се ефикасно избегли периоди недовољног присуства стерилисаних мужјака у природним условима (Hendricks et al. 2005).

Пошто се код мултиволтних врста генерације преклапају, отпуштања треба да буду континуирана, и базирана на оцени преживљавања стерилисаних мужјака. Краћи животни век стерилисаних мужјака, захтева већу учесталост отпуштања, те стога може значајно утицати на повећање трошкова програма (у односу на отпуштање „квалитетнијих“

стерилисаних мужјака који имају већу дуговечност) (Hendrichs et al. 2005). Такође је веома важно имати у виду да је стварно преживљавање оваквих мужјака у природи често драстично ниже него у полу-природним условима (у великим кавезима) где су заштићени од предатора и имају лак приступ храни (Hendrichs et al. 1993).

Да би се могло извршити поређење дуговечности и стопе преживљавања отпуштених стерилисаних и дивљих мужјака, потребно је прво прикупити податке о овим особинама јединки дивље популације. Резултати из огледа у природи базирани на примени технике маркирања, отпуштања и поновног хватања (Mark-Release-Recapture – MRR), показали су да адулти *Ae. albopictus* у природним условима могу живети око 3 недеље. Bonnet and Worcester (1946) и Rosen et al (1976) сакупљали су маркиране јединке 21 дан након отпуштања (Hawley 1988), а Lacroix et al. (2009) чак 23 дана након отпуштања (и то и мужјаке и женке). С друге стране, у огледима које су извели Niebylski and Craig (1994) показало се да иако су женке *Ae. albopictus* живеле у природним условима максимално 24 дана (у просеку 8,2 дана), мужјаци су живели свега 12 дана (у просеку 3,9 дана).

Код процене просечног животног века стерилисаних мужјака *Ae. albopictus*, утврђено је да у случају ирадијације вишим дозама (60 Gy) они живе краће у односу на дивље, док при примени дозе од 40 Gy у лабораторијским условима (Balestrino et al. 2010) и 35 Gy у полу-природним условима (Oliva et al 2012b) није уочена значајна разлика између дуговечности стерилисаних и дивљих мужјака. Тако су нпр. у поменутом огледу у полу-природним условима, и дивљи и стерилисани мужјаци живели 15,5 дана (када нису имали приступ женкама), док су у условима када им је омогућено парење - дивљи мужјаци живели 13,6 дана, а стерилисани 11,6. Ови подаци сугеришу присуство женки скраћује живот мужјака, без обзира на изложеност ирадијацији (Oliva et al 2012b). Иста група аутора је утврдила да је дуговечност стерилисаних мужјака *Ae. albopictus* значајно виша (11,6 дана) ако одмах по излетању добију шећерни раствор за исхрану, него када им је он понуђен 48 сати касније (5,5 дана). Акумулација енергије одмах након излетања је од највеће важности за дуговечност и преживљавање мужјака *Ae. albopictus* (али и за ројење, парење и дисперзију) пошто су њихове енергетске резерве ограничене (Briegel and Kaiser 1973, Foster 1995, Magnarelli 1983), те се при примени SIT-а препоручује отпуштање стерилисаних мужјака из специјално дизајнираних посуда – у којима имају приступ

шећерном раствору одмах након излетања (Сл. 38) (Bellini et al. 2014). Овакав начин отпуштања би према Bellini et al. (2014) условио повећање CIS индекса у полу-природним условима за чак 25% - код мужјака *Ae. albopictus* озрачених са 30 Gy, код којих је првобитни CIS индекс износио 0,96 (Bellini et al. 2013b).



Сл. 38 Специјално дизајнирана посуда која се користи за дистрибуцију стерилисаних лутки мужјака, адаптирана тако да приликом излетања стерилисани мужјаци морају проћи кроз рупе у сунђеру (од полиуретана) који је натопљен раствором шећера, и сходно томе узети „енергетски“ оброк.

Оцењивање стопе дневног преживљавања одређеног соја комараца који ће се користити у сврхе примене SIT програма или његових модификација, као и оцењивање осталих параметара, треба вршити у самој популацији у којој се планира примена SIT-а, јер се добијени подаци могу разликовати. Тако је, нпр. стопа дневног преживљавања лабораторијских мужјака (оцењена помоћу MRR технике, када је за маркирање коришћен флуоресцентни пудер) врсте *Ae. albopictus* у природним условима у северној Италији износила 0,52 (Bellini et al. 2010); док је у Малезији (такође у природним условима) код лабораторијских мужјака *Ae. aegypti* била 0,64, а код мужјака креираног RIDL (*Ae. aegypti*

OX513A) соја: 0,61 (Lacroix et al. 2012). С друге стране, огледи у полу-природним условима на Рејунион острву показали су да је стопа дневног преживљавања стерилисаних лабораторијских мужјака *Ae. albopictus* (доза од 35 Gy) износила 0,82, а фертилних дивљих: 0,85 (Oliva et al 2012b).

Густина популације стерилисаних мужјака у природи варира у складу са учесталошћу отпуштања и стопом морталитета стерилисаних мужјака, и не би смела да опадне испод нивоа потребног за одржавање критичног „overflowing ratio“-а (однос преливања тј. преплављености дивље популације стерилисаним мужјацима) (Barclay 2005, Kean et al 2005, Hendricks et al. 2005), било да је циљ супресија дивље популације (сузбијање на одређени ниво) (Leftwich et al. 2016) или њена ерадикација (Barclay et al. 2013). „Overflowing ratio“ подразумева број стерилисаних мужјака у природи подељен са бројем дивљих мужјака у природи, али се он не може израчунати једноставном деобом стопе отпуштања са бројношћу дивљих мужјака, јер присутни стерилисани мужјаци у природи потичу из неколико сукцесивних отпуштања, а и популација комараца током сезоне расте мање-више константно. Стога је веома важно утврдити везу између критичне (тј. минималне) стопе дневног отпуштања и одржавања потребног „overflowing ratio“-а, што се постиже применом низа једначина које укључују многобројне популационе параметре комараца (нпр. величину популације, стопу пораста популације, фекондитет, дневну стопу преживљавања стерилисаних и дивљих мужјака, њихову дуговечност, оцењивање конкуритивности стерилисаних и дивљих мужјака, утврђивање процента резидуалног фертилитета стерилисаних мужјака, дисперзију стерилисаних мужјака, имиграцију дивљих јединки и сл.) (Barclay et al. 2013).

#### - Дисперзија

Када је у питању планирање примене SIT технике, од изузетне је важности имати податке о начину дисперзије мужјака, да би се могло одредити и планирати растојање између места отпуштања стерилисаних мужјака у природу (односно густина и распоред таквих места) – са циљем обезбеђења потпуног покривања планиране површине у одговарајућим временским интервалима (Bellini et al. 2010). Осим тога, веома је важно имати сазнања и о дисперзији женки због њихове потенцијалне имиграције у третирана подручја, али и због

њиховог епидемиолошког значаја. Ипак, треба имати у виду да ови подаци не могу бити генерализовани, јер умногоме зависе од еколошких и орографских карактеристика одређеног подручја, али и специфичних особина врсте (Petrić et al. 2014). Уопштено говорећи, дисперзија комараца зависи од многих фактора као што су: густина и дистрибуција домаћина (потребних за узимање крвног оброка), приступачност места за овипозицију, места за одмарање, климатске карактеристике (ветар, релативна влажност ваздуха, температура, падавине), конфигурација терена, вегетација, карактеристике објеката у урбаном окружењу и сл. (Petrić et al. 1995, Honorio et al. 2003, Benedict et al. 2007, Marini et al. 2010).

Путем примене MRR технике утврђено је да је опсег летења адулта *Ae. albopictus* углавном ограничен на мање од 1 km (Reiter and Sprenger 1987). Код већине адулта ове врсте комараца дисперзија је ограничена на мање од 180 m током живота (Bonnet and Worcester 1946), мада је у Бразилу забележена дисперзија женки већа од 800 m током периода од 6 дана (Honorio et al. 2003). Дисперзија мужјака *Ae. albopictus* је према истраживању Lacroix et al. (2009) на Ријунион острву веома ограничена и већина мужјака не пређе удаљеност већу од 50 m; Niebylski and Craig (1994) су забележили максималну пређену удаљеност од 225 m у Мисурију (САД); док су Bellini et al. (2010) регистровани да се она кретала у интервалу од 217 до 237 m, у зависности од испитиваног локалитета у Италији. Такође је утврђено да се пређене удаљености мужјака нису значајно повећавале након трећег дана поновног хватања током изођења MRR технике, што сугерише да начин понашања током дисперзије подразумева фазу активне дисперзије током првих дана, након чега мужјаци или постају статични или се шире насумично (Bellini et al. 2010).

Тек се након детаљно прикупљених података о дисперзији мужјака у одређеном подручју (просечне пређене удаљености, максималне пређене удаљености, опсега летења и начина понашања) може израчунати оптимална удаљеност између места отпуштања стерилисаних мужјака током примене SIT-а (нпр. у урбаним деловима северне Италије она је процењена на 150-200 m) (Bellini et al. 2010). Осим важности прикупљања података о дисперзији мужјака у подручју где је планирано извођење SIT-а, подједнако су важна и сазнања о дисперзији женки - да би се могла извршити квантификација утицаја имиграције дивљих женки из нетретираних подручја (IAEA 2010) односно утврдити да ли претходно оплођене

женке могу ући у циљно подручје, јер су оне „имуне“ на отпуштања стерилних мужјака (Robinson et al. 2009). Специфично знање о могућностима дисперзије одређене врсте омогућава дефинисање величине подручја које треба да буде третирано стерилним мужјацима и успостављање ефикасних баријера против имиграције дивљих мужјака и женки (IAEA 2010).

#### - Одабир подручја за примену SIT-а

Да би SIT третман био успешно примењив, веома је важно одабрати одговарајуће подручје за његову апликацију. Утврђено је да се чак и мали прилив (односно имиграција) оплођених женки може значајно негативно одразити на очекивани ниво сузбијања циљне популације (Asman et al. 1981, Knipling et al. 1968, Malcom et al. 2009). Стога, се за примену SIT-а бирају добро изолована подручја - са погодним географским баријерама, или услови када је третирано подручје толико широко да је имиграција фертилних инсеката минимална или је нема (Krafsur 1998, Keng-Hong 2000).

Генерално, идеално подручје примене SIT програма подразумева услове у којима је циљна популација комараца природно изолована, или постоји могућност обезбеђивања изолације помоћу успостављања вештачких баријера (нпр. путем редукције станишта ларви, апликације инсектицида или промене начина коришћења земљишта). Иако се, на први поглед, чини да потреба за изолацијом може знатно ограничити опсег примене SIT-а, она се ипак може унапредити или креирати - комбинацијом различитих фактора (мада то захтева детаљну анализу потенцијала локације и евентуално додатна финансијска средства) (Malcom et al. 2009). Фактори изолације се односе на географске карактеристике, климу, биологију комараца и човекове активности, и према Malcom et al. (2009) могу бити груписани у три категорије:

а) природни: физичке баријере (море, велике реке и језера, планине и брда, пустиње, неплодни терени); вегетација (неодговарајући тип станишта, прекомерна хладовина, изостанак склоништа); превелика растојања (између одговарајућих станишта, до најближег домаћина, од околних села); специфичан временски период (сезонски догађаји, поплаве, миграције птица и осталих животиња); температура (сезонске промене, географска ширина, надморска висина); конкуренција (станишта у суседним зонама

фаворизују бенигног компетитора – нпр. одређене врсте пуноглаваца које конзумирају исту храну као и ларве комараца (Mokany and Shine 2006)).

б) случајно креирани: физичке баријере (зграде, путеви, пруге); вегетација (велике плантаже под једном биљном културом): удаљеност од домаћина или извора воде (ограничено присуство људи, домаћих животиња, подручје без наводњавања и било каквих других система за снабдевање водом); специфичан временски период (сезонски усеви, сезонски распоред животиња).

ц) намерно креирани: физичке баријере (употреба инсектицида, дренаже, уклањање станишта ларви); вегетација (промена сврхе коришћења земљишта нпр. рашчишћавање и сетва); удаљеност (зоне без домаћина, уклањање природних и вештачких станишта ларви); специфичан временски период (временски ограничено или прекинуто снабдевање водом); конкуренција (успостављање бенигнух компетитора или предатора – ларвиворне рибе, копеподе или врста комарца *Toxorhynchites splendens* (Bonizzoni et al. 2013)) (Malcom et al. 2009).

#### - Просторни и временски распоред отпуштања стерилисаних мужјака

Када је одабрано одговарајуће подручје примене SIT-а, треба дефинисати размак између места отпуштања стерилисаних мужјака и временске интервале отпуштања. Они чине два круцијална фактора у планирању SIT програма и стога треба да буду оптимално дефинисани, у складу са трошковима и бенефитом SIT програма (Bellini et al. 2010). Распоред отпуштања може бити веома комплексан, чак и када постоји могућност употребе компјутеризованих модела који инкорпорирају географски информациони систем (Geographical Information system – GIS) у програме планирања извођења SIT-а. На дефинисању одговарајућих интервала и начина отпуштања није рађено пуно истраживања, а овај аспект се свакако мора планирати у складу са параметрима дисперзије мужјака у одређеном подручју, њиховим просечним животним веком и стопом преживљавања, густином популације дивљих комараца и њиховом дистрибуцијом током године, агрегацијом, биотичким потенцијалом дивље популације, условима животне средине, географским карактеристикама подручја (нпр. коришћење различитих начина отпуштања у урбаним и руралним локацијама) итд. (Bellini et al. 2010, Dame et al. 2009).



Тако су нпр. Harris et al. (2011), након прикупљања свих наведених потребних података, вршили отпуштања мужјака *Ae. aegypti* RIDL соја OX513A на Кајманским острвима, са циљем утврђивања могућности парења ових мужјака са дивљим женкама, у природним условима (у питању је била слабо насељена област, са једне стране одвојена океаном, а са осталих некултивисаним природним стаништем). Отпуштања су вршена на подручју од 10 ha на 40 локација (у просеку 4 локације/ha), 3 пута недељно, током месец дана (Сл.39). У природу је, у циљу отпуштања, дистрибуирано укупно 25.500 лутки. Просечна стопа отпуштања је била 465 мужјака/ha/недељно. Након позитивних резултата, Harris et al. (2012) су наставили огледе на Кајманским острвима, са истим сојем комараца, у циљу супресије дивље популације - што је и постигнуто. Током 23 недеље отпуштено је 3,3 милиона мужјака (у стадијуму адулта) на укупној површини од 55 ha. Отпуштања су вршена 3 пута недељно. Просечни однос отпуштања је био 10:1, а просечна стопа отпуштања 4000 мужјака/ha/недељно.



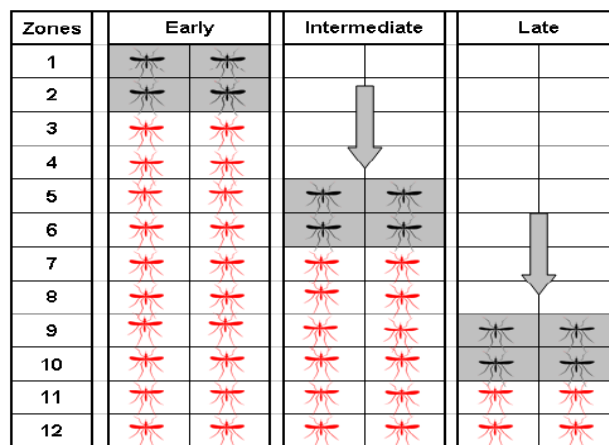
Сл. 39 Ортофото снимак подручја извођења огледа на Кајманским острвима: Третирано подручје од 10 ha је уоквирено; у њему се налази око 200 кућа. Жуте тачке означавају локације отпуштања лутки. Локације постављених овипозиционих клопки су обележене бројевима 10-44

(Извор: Harris et al. 2011)

Bellini et al. (2013a) су пре извођења вишегодишњих огледа примене класичног SIT-а у природи, на неколико локалитета северне Италије (у питању су била. добро изолована мања села) такође извршили подробно прикупљање потребних података да би могли

дефинисати одговарајуће интервале и распоред отпуштања. Тако су нпр. интервали отпуштања стерилисаних мужјака били прилагођавани делу сезоне (6-8 дана - периоди: април-јун и септембар-октобар; 4-5 дана – период: јул -септембар), у складу са природним променама густине дивље популације и стопом преживљавања отпуштених мужјака (која је нижа током врелих летњих месеци услед оскудних извора воде и шећерног оброка). У зависности од локалитета одабрано је 0,44-0,67 места за отпуштање/ha, у размацама који омогућавају преклапање опсега дисперзије стерилисаних мужјака (чија је оптимална удаљеност претходно процењена на 150 m) (Bellini et al. 2010, Bellini et al. 2013a). Величина третиране површине је варирала од локалитета до локалитета (16-45 ha); док је стопа отпуштања износила 896-1590 стерилисаних мужјака/ha/недељно током периода од око 5 месеци (по локалитету), чиме је постигнут значајан ниво стерилитета дивље популације.

Још један од примењиваних концепата просторног отпуштања стерилних мужјака је тзв. концепт „уроланог тепиха“, који подразумева три фазе програма отпуштања у истом подручју (Сл. 40). На приказаној шеми, црвено обојени комарци представљају природну популацију; црни – подручја са отпуштањем стерилних комараца; а празна поља деинфестиране зоне (зоне у којима су комарци ерадииковани). Просторни распоред отпуштања и ширење пратећих деинфестираних зона приказани су стрелицама. Уочава се ширење деинфестираног подручја, захваљујући констанним напорима примене SIT-а (Dame et al. 2009).



Сл. 40 Концепт „уроланог тепиха“ (Извор: Dame et al. 2009)

Што је ниво циљне популације нижи, SIT је ефикаснији, јер је лакше достићи потребан висок однос стерилних дивљих мужјаци, који је неопходан за иницирање смањења популације (Dame et al. 2009). За разлику од примене инсектицида, SIT испољава све већу ефикасност са опадањем бројности циљне популације, тако да је његова апликација добар избор у случају када је циљна популација ниске густине. Ово је илустровано кроз пример ерадикације це-це муве *Glossina austeni* на Унгуја острву (Unguja Island, које припада Занзибарском архипелагу, и познатије је под именом Занзибар), када је популација прво сузбијена путем употребе пиретроида, а тек потом је примењен SIT (Vreysen et al. 2000, Malcom et al. 2009). Ако се, пак, за полазну тачку примене SIT-а, одабере популација високе густине – његова примена ће бити исплативија у каснијој фази апликације (Malcom et al. 2009).

У сваком случају, интеграција осталих мера контроле комараца уз примену SIT-а треба да буде стандард, али поред тога треба посебно обратити пажњу на потребу иницијалног сузбијања популације пре почетка апликације SIT-а (Malcom et al. 2009, Dame et al. 2009). Такође је важно да главни сектори циљне области не пружају могућности за развој ларви (што се може постићи употребом ларвицида и уклањањем станишта ларви) (Harris et al. 2012), као и да су фокуси инфестације добро дефинисани. Ово може водити покривености циљне области путем селективног отпуштања (које се базира на степену појединачних инфестација) и редукцији потребног броја стерилисаних мужјака (што смањује трошкове). Осим тога треба обезбедити довољно велике тампон зоне које ће осигурати ометање имиграције оплођених женки (Dame et al. 2009).

#### - Руковање комарцима, транспорт и методи отпуштања

Евидентно је да минимизација руковања комарцима смањује потенцијални ниво оштећења стерилисаних мужјака - који се може негативно одразити на њихов учинак након отпуштања. Стога је један од важнијих задатака у програмима примене SIT-а развијање и имплементирање технике руковања, транспорта и начина отпуштања стерилисаних мужјака, која би обезбедила што мањи негативан утицај на њихово преживљавање и квалитет након отпуштања. Такође, важно је имати у виду да је за огледе великих размера неопходно развити ефикасне методе транспорта и отпуштања неколико милиона мужјака, и са земље и из ваздуха, на начин који омогућава третирање чак и тешко приступачних

подручја. Слични принципи се већ користе при примени SIT-а у контроли воћних мува и це-це мува, и већ се ради на њиховој адаптацији за отпуштања комараца, мада се мора узети у обзир да су комарци много осетљивији (IAEA 2014b).

Када је у питању примена SIT-а код врста рода *Anopheles*, отпуштање стерилисаних мужјака у природу се мора вршити у њиховом адултном стадијуму због специфичности начина раздвајања полова (деталније описаног у одељку: Начини сепарације полова), све док не постану доступни одговарајући генетички сојеви који би се користили у сврхе раздвајања полова пре стадијума адулта. Тренутно се стерилисани мужјаци рода *Anopheles* отпуштају у природу путем ослобађања адулта из кавеза, дистрибуираних на унапред утврђена места (IAEA 2014b).

У случају примене SIT-а код врста рода *Aedes*, отпуштање стерилисаних мужјака у природу се такође може вршити у стадијуму адулта (Harris et al. (2012), мада се до сада ипак најчешће изводило у стадијуму лутке. Овакав начин подразумева транспорт лутки (од узгајалишта до места ирадијације, и од места ирадијације до места отпуштања) у пластичним посудама са водом, које су смештене у топлотно изоловане кутије. На самом месту отпуштања, лутке се премештају у специјалне пластичне посуде за излетање напуњене водом, које могу бити конструисане тако да тек излетелим стерилисаним мужјацима омогућавају приступ шећерном раствору (што им даје неопходну почетну енергију). Посуде са луткама се постављају на земљу, у вегетацију и сеновита места (Bellini et al. 2013a, Bellini et al. 2014).

Пошто места отпуштања некада могу бити веома удаљена од места стерилизације, IAEA и екстерни сарадници све интензивније истражују могућности усавршавања постојећих и осмишљавања нових процедура транспорта и руковања комарцима (који треба да буду отпуштени). Тако се, у сврхе што учинковитијег транспорта до удаљених подручја, разматра могућност њиховог расхлађивања.

У будућим истраживањима овог типа, ће прво бити потребно утврдити да ли су лутке стерилисаних мужјака отпорније на расхлађивање од адулта (да би се дефинисало у ком од та два стадијума је учинковитије транспортовати комарце). Могућност транспорта

расхлађених лутки до места њиховог отпуштања би била од великог значаја – јер би им се на тај начин продужио временски период потребан за излетање адулта. У складу са тим потребно је извести низ експеримената који подразумевају: одређивање оптималне температуре расхлађивања лутки (нпр. 6-12 °C), која треба да буде усклађена са трајањем расхлађивања; утврђивање најпогоднијег влажног медијума за транспорт расхлађених лутки; дизајнирање оптималних посуда за њихов транспорт; као и процењивање највише могуће густине лутки по јединици водене површине (или влажног медијума) која не изазива повећање њиховог морталитета или оштећења.

У случају да се не планира отпуштање мужака у стадијуму лутке, него у стадијуму адулта, ИАЕА и екстерни сарадници посвећено раде на дефинисању нових и учинковитијих техника (у односу на отпуштање адулта из кавеза, како се до сада углавном радило), те се планира отпуштање адулта из ваздуха (путем беспилотних летелица или малих авиона који имају интегрисане специјалне машине за отпуштање инсеката) или са земље (из возила у покрету). Да би се дошло до реализације оваквих начина отпуштања мужјака комараца, потребно је дефинисати и конструисати читав низ ставки. Ово подразумева обезбеђивање објектата са кавезима за излетање мужјака у које треба допремити лутке након ирадијације; развијање дизајна таквих кавеза који би имали тзв. касете за интродукцију лутки (предлаже се да оне буду на дну); затим развијање апаратуре за исхрану одраслих мужјака шећерним раствором пре отпуштања и процену потребне количине шећера. Такође је неопходно дефинисати начин расхлађивања одраслих мужјака (што омогућава њихову имобилизацију у циљу лакшег руковања и смањења могућности оштећења); те осмислити начин сакупљања расхлађених мужјака пре њихове интродукције у касете за отпуштање (које би биле део машина за отпуштање одраслих са земље или из ваздуха). Постојеће машине за отпуштање инсеката треба прилагодити отпуштању комараца. Осим тога, потребно је утврдити оптималну запремну касета за интродукцију расхлађених одраслих мужјака (које би се налазиле у машинама за отпуштање одраслих); као и оптималну запремину касета за интродукцију лутки у кавезе за излетање мужјака (које би биле смештене на дно кавеза), и то за сваку врсту комараца код које се примењује SIT или нека његова модификација (IAEA 2014b).

Изузев наведених ставки потребно је дефинисати и висину отпуштања (ако се примењује отпуштање из ваздуха), те оптималну густину комараца која им не проузрокује оштећења током примене ових операција, стопу отпуштања, брзину летења или кретања возила, ширину прелетних линија и сл. Такође, пошто просторна дистрибуција комараца у природи није хомогена, треба развити системе који ће омогућити отпуштање различитих доза односно унапред дефинисати дозу отпуштања за сваки полигон понаособ. Претходно треба направити одговарајуће мапе са оптималном и хомогеном дистрибуцијом отпуштања (Сл. 41) и развити софтвер за контролу стопе отпуштања у складу са варирањем густина отпуштања (IAEA 2014b).



Сл. 41 Графички пример дистрибуције планираних тачака отпуштања мужјака базиран на употреби GIS-а (Извор: IAEA 2014b).

Када је у питању метод отпуштања адулта са земље (из возила у покрету), ситуација је мало компликованија, јер је отпуштање стерилинисаних мужјака везано за постојећи систем путева, те стога није могуће хомогено покрити подручје које треба да буде третирано. Зато се предлаже да се овај систем користи само ако услед одређених прописа, закона или трошкова није могуће користити метод отпуштања из ваздуха; затим у случају веома малих огледа (у циљу сузбијања); или у случају лоших временских услова (да не би

дошло до пропадања мужјака већ припремљених за отпуштање). Примена система отпуштања комараца из возила у покрету тренутно подразумева једноставно отварање посуда са комарцима и њихово ослобађање од стране техничара који седи у задњем делу возила (Сл. 42), а у будућности се планира напреднији начин који укључује употребу специјалних машина за отпуштање (ground release machine – GRM) – што се већ употребљавало у сузбијању *Ceratitis capitata* (у огледима мањих размера у Хрватској и Мексику) (IAEA 2014b).



Сл. 42 Отпуштање RIDL соја *Ae. aegypti* OX513A у Бразилу, са земље (из возила у покрету) - огледе су изводиле компаније: „Oxitec“ и „Moscamed“. Техничар отвара посуде са комарцима док се возило креће кроз област планирану за отпуштање (Извор: IAEA 2014b).

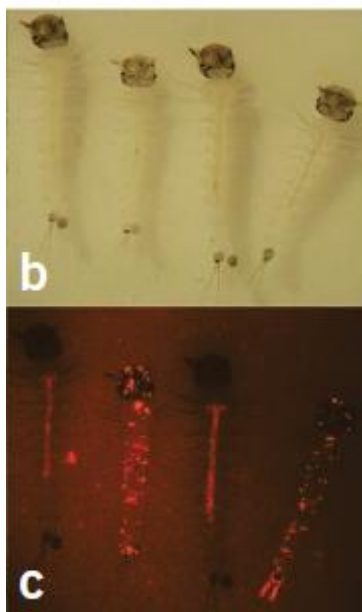
Било која техника да се користи у будућности, мора се узети у обзир да расхлађени одрасли комарци морају да се опораве и постану мобилни пре отпуштања, у циљу обезбеђивања њиховог „разбуђивања“ пре него што дотакну тло. Дакле, комарци се морају држати у хладним условима (на 6 °C) да би поднели процесе руковања пре отпуштања, али се непосредно пре отпуштања такође морају и загрејати (на 15 °C) да би могли да лете. Стога је потребно конструисати двофазне машине за отпуштање, које укључују и корак загревања пре отпуштања (IAEA 2014b).

Методи и локације отпуштања морају бити дефинисани и тестирани пре почетка примене програма, те примењиви у свим предвиђеним временским условима (Benedict and Robinson 2003).

### 2.7.9. Начини евалуације програма и развој маркера за мониторинг отпуштених комараца

Праћење се врши током целог извођења SIT-а и омогућава евалуацију програма и одређивање момента престанка отпуштања стерилисаних мужјака (Dame et al. 2009). До сада су се за оцену ефикасаности отпуштених мужјака у индуковању стерилитета у дивљу популацију комараца, са успехом користиле технике засноване на:

- а) израчунавању процента стерилитета јаја (сакупљених из овипозиционих клопки, или положених у лабораторији од стране ухваћених женки) (Bellini et al. 2013a, Robinson et al. 2009);
- б) процени смањења броја јаја у овипозиционих клопки (код *Aedes* врста) (Bellini et al. 2013a),
- ц) процени броја (односно удела) флуоресцентних ларви у овипозиционим клопкама – код RIDL технике (сој *Ae. aegypti* OX513A чије ларве носе DsRed флуоресцентни маркер – Сл. 43), као и броја адулта у BG-Sentinel клопкама (Harris et al. 2011);
- д) методама обележавања отпуштених мужјака стабилним изотопом (који се преноси током парења, те касније уочава у дисекованим сперматекама дивљих женки) (Helinski et al. 2007) итд.



Сл. 43 На фотографијама су приказане ларве дивљег типа комараца –ДТ, и RIDL соја *Ae. aegypti* OX513A. Редослед је исти на обе фотографије (с лева на десно: ДТ, OX513A, ДТ, OX513A)

Горња фотографија: ларве под обичним осветљењем – не уочава се разлика између ДТ и OX513A

Доња фотографија: ларве под флуоресцентним осветљењем. Уочава се карактеристичан тачкасти образац (тј. DsRed флуоресцентни маркер) код ларви OX513A (2. и 4. ларва).

(Извор: Harris et al. 2011)



За праћење односно мониторинг отпуштених комараца и израчунавање њихове ефикасности у SIT програму великих размера, пожељно је развити одређене нове уочљиве маркере (било да су фенотписки/генетички или трансгенетички). Нпр. требало би развити наследне флуоресцентне маркере да би се лакше препознао и детектовао учинак отпуштених инсеката (путем молекуларне технике) (IAEA 2014a). Ово је већ почето са RIDL сојевима комараца (нпр. *Ae. aegypti* OX513A, *Ae. albopictus* OX3688) код којих отпушени мужјаци преносе на своје потомство флуоросцентни маркер, који је јасно видљив код ларви и лутки. На основу тога се може пратити учинак парења оваквих мужјака у природи, те сходно томе повећавати или смањивати њихов број током отпуштања, у циљу оптимизације ефикасности отпуштања и сузбијања комараца – што је кључна особина овог приступа (Phuc et al. 2007).

### 3. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА И РАДНА ХИПОТЕЗА

Услед изложености опасности од продора *Aedes albopictus* у Србију и могуће интродукције болести чији се проузроковачи преносе овим вектором, главни циљ овог истраживања био је допринос успеху SIT програма, са намером интегрисања ове технике у стратегије које могу спречити насељавање *Ae. albopictus* у наш регион. Осим тога, ако дође до имплементације SIT-а у Србији, обучен и високо квалификован локални кадар (припремљен да правилно изведе сваки поједини корак током SIT апликације) био би од круцијалног значаја, што је још један од разлога укључивања наше земље у овај тип истраживања.

С обзиром да су побољшање продуктивности масовног узгоја, као и што бољи квалитет масовно узгојених стерилисаних мужјака од фундаменталног значаја за успех SIT-а, ова студија је обухватила истраживање обе наведене фазе овог програма имајући у виду следеће циљеве:

а) допринос функционисању постројења за масовни узгој инсеката путем детерминације оптималне величине кавеза за стандардни масовни узгој

Познато је да вештачки услови гајења значајно утичу на виталност узгојеног материјала, те је у овој студији (Оглед I) извршено поређење утицаја три различите величине кавеза за масовни узгој *Ae. albopictus*, на дужину крила, преживљавање адулта и продукцију јаја, током 20 генерација колонизације. Дужина крила је значајна морфолошка променљива, која је повезана са виталношћу комараца преко величине тела и коришћена је као параметар процене утицаја величине кавеза на виталност гајених комараца (што подразумева и продуктивност лабораторијске колоније и дуговечност јединки), а који се може снажно одразити на редукцију ефикасности стерилисаних мужјака или генетички модификованих мужјака након отпуштања у природу. На крају ће бити одабрана оптимална величина кавеза за стандардизацију масовног узгоја, у циљу минимизације

селекције оних особина које би могле смањити учинак стерилисаних мужјака у природним условима.

Претпоставило се да ће једна од три испитиване величине кавезе показати најнижи негативан утицај на оригиналне карактеристике популације комараца.

б) оцену конкурентности лабораторијски узгојених стерилисаних мужјака

ц) процену способности стерилисаних мужјака да индукују стерилитет у циљној популацији

д) праћење додатних важних индикатора квалитета трију испитиваних сојева

е) детерминацију соја са најпогоднијим карактеристикама за примену SIT-а

ф) дефинисање евентуалних недостатака протокола у циљу његовог унапређења

Пре примене SIT-а у циљу контроле природне популације комараца, неопходно је оцртати квалитет масовно узгојених инсеката у полу-природним условима, како би се могло дефинисати да ли су масовно узгојени стерилисани мужјаци довољно конкурентни у односу на фертилне мужјаке из дивље популације, у процесу парења са женкама (приказано у Огледу II). Ова процена је неопходна не само за дефинисање потребног броја стерилисаних мужјака, него и због евентуалне модификације протокола ради ублажавања негативног утицаја на конкурентност стерилисаних мужјака (промене у масовном узгоју, транспорту или начину отпуштања).

Претпоставка је да ће доза ирадијације од 30 Gy бити довољна за индукцију стерилитета у циљну популацију, те да ће стерилисани и фертилни мужјаци бити једнако конкурентни без обзира на испитивану комбинацију сојева.

Осим тога, очекивало се да ће анализе резултата изведене на основу сакупљених података, као и запажања током извођења експеримента, допринети формирању идеја за побољшање осетљивости овог метода тестирања, као и унапређењу досадашњих протокола.

## 4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

### 4.1. Оглед I Испитивање услова масовног узгоја

#### 4.1.1. Колонија комараца и методе узгоја

Колонија *Ae. albopictus* (сој RER), коришћена у овом експерименту, је потекла од јаја сакупљених у природи, у три различита урбана подручја региона Емилија Ромања (Emilia Romagna) у северној Италији, током 2011. године. Поменути прикупљена јаја су стављена на пиљење и гајена до стадијума адулта у лабораторији Centro Agricoltura Ambiente (CAA) „Giorgio Nicoli“, Crevalcore, Италија. Адулти су потом смештени у кавез од плексигласа, димензија 40x40x40 cm, а женкама је дат крвни оброк у циљу добијања јаја потребних за експеримент. Колонија је одржавана током 20 генерација у комори са контролисаним условима (температура: 28±1°C, RH: 80% и фотопериод 14:10 часова светлости/таме).

Пиљење јаја, гајење ларви, лутки и адулта било је изведено у складу са стандардним процедурама (Bellini et al. 2007, Damiens et al. 2012, Puggioli et al. 2013). Процедура пиљења јаја и гајења ларви је детаљније приказана и у Огледу II (с тим да су поједини детаљи прилагођени новом експерименталном дизајну Огледа II).

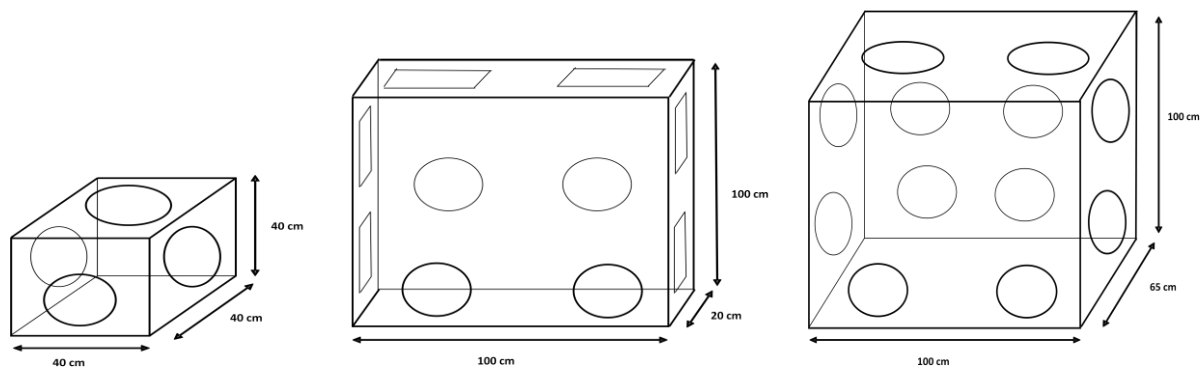
#### 4.1.2. Опис кавеза и примењених операција

У овом експерименту су коришћена три кавеза од плексигласа (Сл. 44) следећих димензија (дужина x ширина x висина):

Кавез С1: 40 x 40 x 40 cm (запремина 64 литре – С1)

Кавез С2 100 x 20 x 100 cm (запремина 200 литара – С2)

Кавез С3 100 x 65 x 100 cm (запремина 650 литара – С3)



Сл. 44 Шематски приказ димензија и изгледа кавеза коришћених у експерименту  
(Извор: Puggioli A. 2014)

У кавезе је, у складу са фазом гајења комараца, било интродуковано следеће: у С1: 1 посуда са луткама, 2 посуде за полагање јаја, 1 хранилица са шећерним раствором, 1 хранилица са крвљу; у С2: 4 посуде са луткама, 6 посуде за полагање јаја, 3 хранилице са шећерним раствором, 3 хранилице са крвљу; а у С3: 13 посуде са луткама, 20 посуде за полагање јаја, 10 хранилица са шећерним раствором, 10 хранилица са крвљу.

Сваки кавез је имао кружне отворе покривене пластичном мрежицом, а најмање један од ових отвора је имао рукав од тканине који је омогућавао приступ унутрашњости кавеза (Balestrino et al. 2014). Позиција сваког кавеза у клима комори је била мењана након сваке генерације, да би се избегао евентуални утицај нехомогених микро услова. Густина адулта у свим кавезима је била 20 адулта/литри кавеза, са односом полова од приближно 1:1.

У свакој генерацији је у кавезе био интродукован адекватан број лутки: 1.280 у С1; 4.000 у С2; и 13.000 у С3. Лутке су пласиране у кавезе у посудама од 500 ml (Сл. 47), од којих се у свакој налазило приближно 1000 лутки (Сл. 46) (чији је број био одређен волуметријском методом – Сл. 45). Током целог огледа је укупно процесуирано 365.600,00 лутки. Захваљујући протандрији уоченој код ове врсте, лутке су биле сакупљане трећег дана од почетка улуткавања да би се обезбедио процентуални однос полова од 50:50.



Сл. 45 Одређивање броја лутки волуметријском методом



Сл. 46 Посуда од 500 ml са око 1000 лутки



Сл. 47 Посуда са луткама интродукована у С1

(Оригинал)

Након излетања, адултима је за исхрану понуђен 10% раствор шећера *ad libitum* (Сл. 48), док су женке сваке генерације током живота добијале и по два крвна оброка (седмог и осмог дана након интродукције лутки у кавезе). Крвни оброк је чинила свежа, дефибринисана свињска крв добијена из кланице (обрађена посебном техником, описаном у мастер раду ауторке ове докторске дисертације: Pudar 2012), загревана на температури од 37°C током 15-20 минута, те путем специјалних хранилица пласирана у експерименталне кавезе током 30 минута (Сл. 49 а и б).



Сл. 48 Хранилица са 10% раствором шећера



Сл. 49 а и б Хранилица са крвним оброком за женке (Оригинал)



Јаја су полагана на белу филтер хартију (IF C140, Industrial Filtro S.r.l., Cologno Monzese, Italy), постављену у пластичне посуде запремине 250 ml, напуњене са 100 ml дејонизоване воде (Сл. 50). Пет дана након другог крвног оброка, филтер хартије са јајима су сакупљане (Сл. 51), те су са њих одстрањиване све остале примесе биолошког материјала (угинули одрасли, делови ногу, крила и др.), да би се потом стављале на сушење у клима комору током 24-48 h (Сл. 52). Затим су скениране, а јаја су преборајана аутоматски (Сл. 53 а и б), помоћу софтвера ImageJ - Image processing and analysis programme (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD) (Bellini et al 2007).



Сл. 50 Посуде за полагање јаја

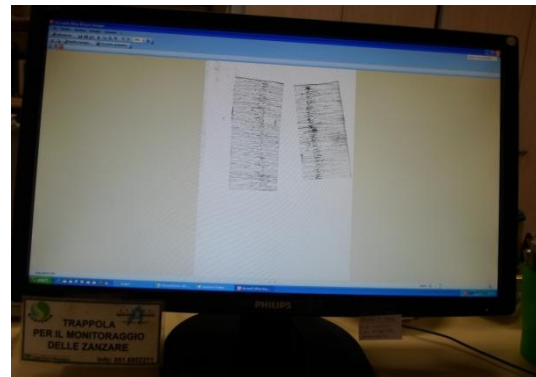


Сл. 51 Сакупљање посуда за полагање јаја из кавеза С3

(Оригинал)



Сл. 52 Сушење хартија са јајима у клима комори



Сл. 53 а и б: Скенирање филтер хартија са јајима и бројање јаја помоћу софтвера ImageJ

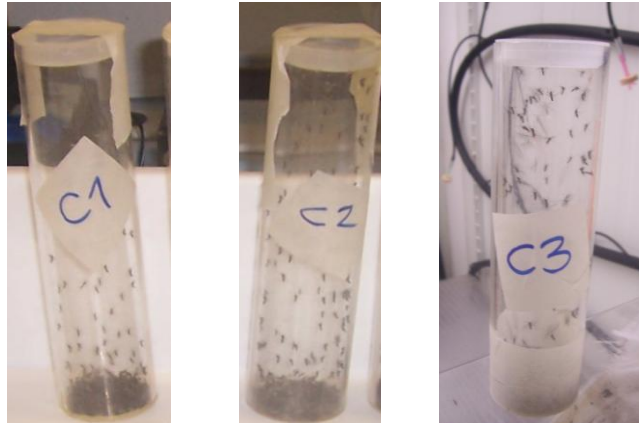
(Оригинал)

### 4.1.3. Мерење дужине крила, оцена стопе преживљавања и продукција јаја

Узорак од 50 мужјака и 50 женки (којима ће бити мерена дужина крила) из сваког кавеза, обезбеђен је путем аспирирања адулта на почетку сваке генерације (док су крила још неоштећена) (Сл. 54 и 55). Аспирирани адулти су потом замрзнути на  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , и затим чувани на тој температури до момента дисекције.



Сл. 54 Узимање узорка адулта

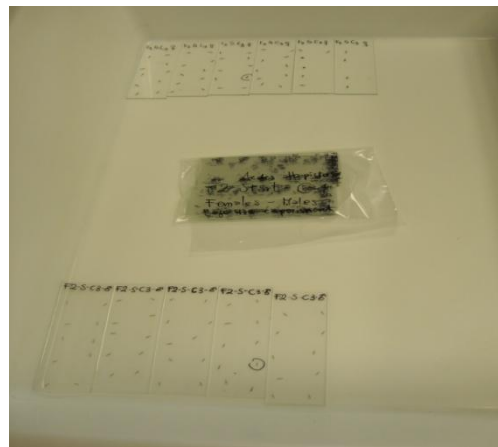


Сл. 55: Узорци мужјака и женки из различитих кавеза (за мерење дужине крила)  
(Оригинал)

Одлучено је да се дисекује увек десно крило (осим у случају оштећења, када је рађена дисекција левог) и то што ближе узглобљењу крила на *mesothorax*-у, изнад алуларног усека, употребом fine пинцете (Сл. 56). Након дисекције, крило је премештено на предметно стакло у кап дејонизоване воде. На једном предметном стаклу је поређано по 10 крила (Сл. 57).



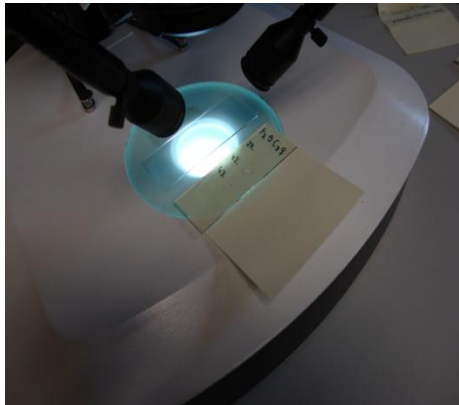
Сл. 56 Дисекција крила под стереомикроскопом, повезаним са дигиталном камером  
(Оригинал)



Сл. 57 По 10 дисекованих крила на сваком предметном стаклу



Непосредно након што вода испари, свако од њих је фотографисано (Сл. 58) дигиталном камером (Сл. 59) постављеном на TV2/3”С 0,63 фотоцев, коришћењем стереомикроскопа са окуларом увећања 10x и објективом подешеним на повећање од 2,5x (Сл. 60). За фотографисање је коришћен софтвер uEye Demo (IDS Imaging Development Systems GmbH). Свака фотографија је сачувана у jpg формату са резолуцијом од 96 dpi.



Сл. 58 Фотографисање крила



Сл. 59 Камера  
(Оригинал)



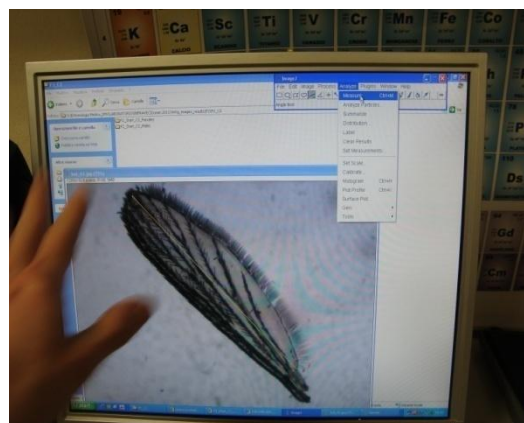
Сл. 60 Стереомикроскоп  
са камером

Дужина крила је дефинисана као дужина од алуларног усека (Al.) до врха крила (искључујући ивичне љуспице) између радијалних нерава  $R_3$  и  $R_{4+5}$  (Сл. 61). Софтвер ImageJ је коришћен за мерење дужине крила по линеарном методу (Сл. 62) (Mains 2007).

Просечна дужина крила и мужјака и женки, из сваког кавеза, је израчуната за генерације: F1 - F7, F9, F11, F13, F15, F17, F18, и F20. Укупно је дисековано и измерено 4.200 крила.

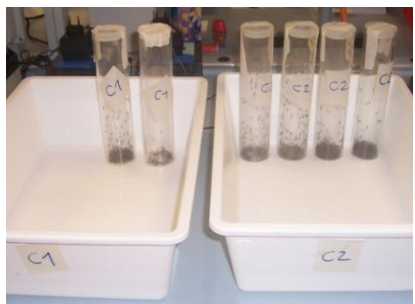


Сл. 61 Дигитална слика десног крила женке *Ae. albopictus* (жута линија показује дистанцу означену као дужина крила) (Извор: САА 2011)

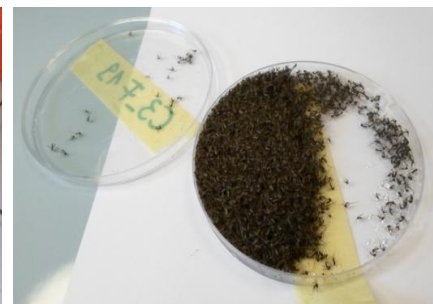


Сл. 62 Мерење крила помоћу софтвера ImageJ (Оригинал)

На крају сваке генерације (односно 15 дана након интродукције лутки) сви преживели одрасли комарци, из свих кавеза, су бивали елиминисани помоћу аспиратора (Сл. 63) и након замрзавања пребројани (за сваки пол понаособ) (Сл. 64); док су уинули одстрањени. Стопа преживљавања (укупно за оба пола (у даљем тексту: преживљавање адулта); као и засебно за мужјаке и за женке) је оцењена путем поређења броја преживелих комараца и укупног броја лутки интродукованих у сваки кавез, за генерације: F2 - F5, F7, F9, F11, F13, F15, F17, F19.



Сл. 63 Елиминисани преживели адулти из свих кавеза, на крају сваке генерације, пред замрзавање



Сл. 64 Замрзнути адулти из C3, спремни за пребројавање

(Оригинал)

Просечан број јаја положен по женки, за сваки кавез, је одређен путем дељења укупног броја положених јаја по кавезу са укупним бројем женки у том кавезу (под претпоставком да су све женке узеле крвни оброк и положили јаја). Укупан број женки (и мужјака) је био базиран на односу полова утврђеном на почетку генерација: F2 - F7, F9, F11 и F12 - F20.

#### 4.1.4. Статистичка обрада добијених резултата

Дужина крила, стопа преживљавања и стопа продукције јаја у свакој од тестираних величина кавеза анализирани су у програму Statistica 12.6, током целог периода од 20 генерација, као и првог и другог потпериода засебно.

У току анализе резултата уочено је да су сви тестирани параметри испољили сличну динамику опадања до средине колонизационог периода, а затим почели са порастом. Због тога је време развоја додатно подељено у 2 потпериода. Генерација карактеристична по најнижој вредности одређеног параметра била је иста у сва три кавеза, али се разликовала

између параметара (одн. била је специфична за сваки испитивани параметар). Код посматрања дужине крила, први (опадајући) и други (растући) потпериод били су: F2-F11 и F12-F20; код преживљавања адулта: F2-F9 и F10-F20; а код продукције јаја: F2-F14 and F15-F20.

Наведени потпериоди су коришћени приликом извођења анализе варијансе (*ANOVA*) и вишеструког теста артиметичких средина по Duncan-у (за анализирање разлика одређеног параметра између кавеза), као и при тестирању значајности нагиба регресионих правих (за сваки од посматраних параметара) у свим кавезима и хомогености нагиба регресионих правих (тест паралелизма) међу кавезима.

Другачија подела на потпериоде је изведена једино у случају извођења Пирсонове (Pearson) корелационе анализе - коришћене за тестирање могуће повезаности испитиваних параметара. Да би се обезбедио приближно једнак број генерација у сваком потпериоду, F11 је одабрана за преломну генерацију између два потпериода. Оваква подела се такође подудара са потпериодима уоченим код дужине крила – параметром који се најчешће користи за тестирање корелација са преживљавањем адулта и продукцијом јаја.

## **4.2. Оглед II Испитивање учинка стерилисаних мужјака**

### **4.2.1. Колонија комараца**

У овом експерименту су коришћена три различита соја *Ae. albopictus*: два лабораторијска и један дивљи.

Лабораторијски сојеви (RER i Rimini) су потекли од јаја сакупљених у природи путем овипозиционих клопки, а потом одржавани у лабораторијским условима у Centro Agricoltura Ambiente (CAA) „Giorgio Nicoli“, Crevalcore, Италија током различитог броја генерација. Сој RER генерације F8 и F9 (коришћен током 2012. год.) потекао је од јаја сакупљених у три различита урбана подручја региона Емилија Ромања (Emilia Romagna) у северној Италији током 2011. год; док је сој Rimini генерације F52, F53, F54 (у даљем тексту: LAB) потекао је од јаја сакупљених у Риминију (северна Италија), током 2004. год. (коришћен је током 2013. и 2014. год.).

Дивљи сој Crevalcore генерација F0 (у даљем тексту: WILD) потекао је од јаја сакупљених у два урбана подручја у Crevalcore-у (Болоња, северна Италија) током 2013. и 2014. год. и гајен је до стадијума лутке (које ће учествовати у експерименту) без иједне лабораторијске генерације. WILD сој је такође коришћен само током 2013. и 2014. год.

### **4.2.2. Експериментални тунели, комбинације сојева и периоди тестирања**

У овом експерименту у полу-природним условима коришћена су четири експериментална тунела (кавези димензија 8 x 5 x 2,8 m (дужина x ширина x висина)) направљена од полукружне металне конструкције на коју је била постављена мрежа за изолацију тестираних комараца (Arrigoni Biorete 40 mesh) и додатно покривена мрежом која обезбеђује 70% засене (Arrigoni Ombraverde 70% shadow) (Arrigoni, Uggiate-Trevano, Италија) (Сл 65 и 66). Тунели су постављени у приградској области Болоње која обилује вегетацијом (у Centro Agricoltura Ambiente (CAA) „Giorgio Nicoli“, Crevalcore, Италија) и земљиште на које су постављени је свакодневно наводњавано да би се обезбедила висока

влажност и поспешно пораст вегетације. Између тунела су постављене три BG Sentinel клопке (Biogents, Немачка) у циљу хватања околне популације дивљих комараца и спречавања њиховог евентуалног уласка у тунеле током уласка и изласка из тунела (Сл. 67 и 68).



Сл. 65 Изглед тунела



Сл. 66 Вегетација у тунелу

(Оригинал)



Сл. 67 и 68 Позиције различитих експерименталних тунела (уочавају се BG sentinel клопке (бела стрелица), као и систем за наводњавање (плава стрелица))

(Оригинал)

Током дела експеримента који се односи на тестирање компетитивности мужјака (у даљем тексту: третман) по тунелу је била постављена једна од четири различите комбинације сојева *Ae. albopictus* (LAB (Rimini) и WILD) те интродуковано по 100 стерилисаних и 100 нестерилисаних (фертилних) мужјака који су се такмичили за парење са 100 неспарених

женки (однос 1:1:1) (Табела 2), док је за контролу експеримента коришћен само LAB сој (RER) а по тунелу је интродуковано 100 фертилних мужјака и 100 неспарених женки (однос 1:1). Током трајања целог експеримента укупно је за интродукцију у тунеле издвојено 5300 лутки *Ae. albopictus* (3400 мужјака и 1900 женки) (Табела 1).

Табела 1 Комбинације сојева *Ae. albopictus*, број понављања и број лутки

Table 1 *Ae. albopictus* strain combinations, number of replicates, and number of pupae

комбинације сојева strain combinations	једно понављање one replicate		Бр. понављања N replicates	сва понављања all replicates		укупан бр. лутки total N pupae
	Бр. лутки мужјака N male pupae	Бр. лутки женки N female pupae		Бр. лутки мужјака N male pupae	Бр. лутки женки N female pupae	
	<b>Контрола/Control (0 : ♂LAB_ ♀LAB)</b>	100		100	4	
♂LAB 30 Gy : ♂WILD_ ♀WILD	200	100	4	800	400	1200
♂LAB 30 Gy : ♂WILD_ ♀LAB	200	100	4	800	400	1200
♂WILD 30 Gy : ♂LAB_ ♀WILD	200	100	4	800	400	1200
♂WILD 30 Gy : ♂LAB_ ♀LAB	200	100	3	600	300	900
<b>укупно total</b>	<b>900</b>	<b>500</b>	<b>19</b>	<b>3400</b>	<b>1900</b>	<b>5300</b>

Табела 2 Комбинације сојева у тунелима третмана (након сваког тестирања примењен је систем ротације)

Table 2 Strain combination in treatment enclosures (rotation scheme was performed at any trial)

	Мужјаци Males	Женке Females
ТУНЕЛ 1 ENCLOSURE 1	100 LAB 30 Gy : 100 WILD	+ 100 WILD
ТУНЕЛ 2 ENCLOSURE 2	100 LAB 30 Gy : 100 WILD	+ 100 LAB
ТУНЕЛ 3 ENCLOSURE 3	100 WILD 30 Gy : 100 LAB	+ 100 WILD
ТУНЕЛ 4 ENCLOSURE 4	100 WILD 30 Gy : 100 LAB	+ 100 LAB

Пошто смо на распалобању имали свега четири тунела, у третману су, кад год су услови дозвољавали, истовремено тестиране све четири комбинације сојева (Табела 2) (три комбинације су изведене у укупно четири понављања, а једна у три понављања), да би се омогућило да различите комбинције третмана имају приближно исте временске услове. Контрола је изведена током засебног тестирања (у 4 понављања) и увек је имала исту комбинацију сојева (Табела 1).

Осим тога, примењен је систем ротације, тако да је приликом сваког наредног тестирања, истоветна комбинација сојева била интродукована у различит тунел да би се избегао евентуални утицај микроклиматских услова (односно утицај различитих позиција тунела), иако су Bellini et al (2013b) у истраживањима током 2007., 2008. и 2009. год. показали да нема значајне разлике у просечном броју јаја/женки и стопи пиљења јаја између различито позиционираних тунела.

Експеримент је изведен у укупно 11 различитих временских периода током 2012., 2013. и 2014. године, и увек у летњем периоду (током јула, августа и прве две декаде септембра).

Техничке и орагнизационе потешкоће са којима смо се сусрели током изођења овог експеримента условиле су да се током прве године (2012.) спроведе само део експеримента који се односио на контролу и то у четири временска периода (једно понављање/периоду) али увек у различитом тунелу, што је омогућило добијање података из сва четири тунела.

Део експеримента који се односио на третман (односно испитивање конкуритивности стерилисаних и нестерилисаних мужјака различитих сојева) изведен је током наредне две године у укупно седам периода (2013. год. у три, а 2014. год. у четири).

У наставку су описане примењене операције (као и број потребних јединки *Ae. albopictus*) које се односе на третман и то у случају истовременог тестирања свих различитих комбинација/периоду. У контроли су примењене исте операције (изузев ирадијације мужјака), кориштен је само LAB сој (RER), те је и број потребних јединки био нижи (Табела 1).

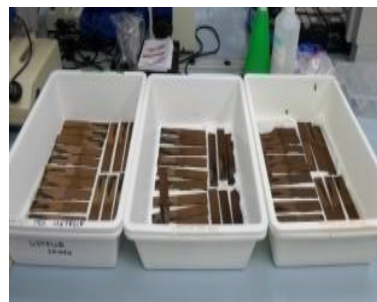
### 4.2.3. Узгој комараца

#### - Сакупљање јаја

Прва етапа експеримента (који се односи на третман) подразумевала је обезбеђивање довољног броја јаја LAB и WILD сојева *Ae. albopictus*, а процедура њиховог сакупљања се разликовала.

У случају LAB соја, женкама су понуђена три узастопна крвна оброка, након чега су у кавезе за узгој (мали кавез - C1) пласиране посуде за полагање јаја (две посуде/кавезу) а положена јаја су процесуирана у складу са описаном процедуром.

Јаја WILD соја су, пак, сакупљена у природи путем овипозиционих клопки (Сл. 69). Дрвене шпатуле су служиле као овипозициони супстрат и биле су постављене у црне пластичне посуде (запремине 1400 ml) напуњене водом до 2/3 своје висине, и позициониране у хладовину са циљем да се женкама дивље популације *Ae. albopictus* обезбеде што бољи услови за полагање јаја. Након неколико дана шпатуле (са јајима *Ae. albopictus*) су сакупљане (Сл. 70) и транспортоване у лабораторију на сушење током шест дана да би се омогућило завршавање процеса ембриогенезе (Сл. 71, 72, 73).

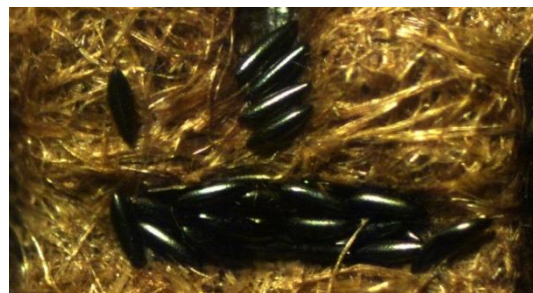
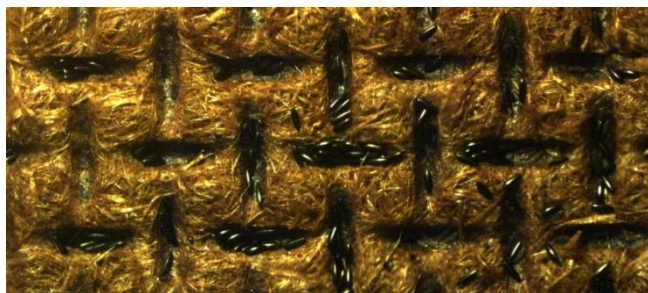


Сл. 69 Овипозициона клопка    Сл. 70 Сакупљање шпатула са јајима WILD соја *Ae. Albopictus*    Сл. 71 Сушење шпатула

клопка

WILD соја *Ae. Albopictus*

(Оригинал)



Сл. 72 и 73 Јаја WILD соја *Ae. albopictus* положена на дрвене шпатуле

(Оригинал)



### - Пиљење и узгој ларви

У циљу обезбеђивања услова за уједначено пиљење ларви, филтер хартије са јајима LAB соја (Сл. 74) и шпатуле са јајима WILD соја (Сл. 75) смештене су у засебне затворене тегле (запремине 1000 ml) са дејонизованом водом (700 ml/тегли) у коју је додата суспензија пивског квасца у праху (brewer's yeast YBD-1KG, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), и посебних бактерија (Vacto Nutrient Broth® OXOID LTD, Basingstoke, Hampshire, England) које стимулишу истовремено пиљење ларви током ноћи, тако што снижавају концентрацију кисеоника у тегли. Цео поступак је изведен у складу са стандардним процедурама за пиљење ларви (*SOP - Standard Operating Procedures*) (Bellini et al. 2007).

Услед раније примећене чињенице да се ларве WILD соја развијају брже од ларви LAB соја (Сл. 76 и Сл. 77), јаја WILD соја су стављена на пиљење један дан касније да би се обезбедио што уједначененији развој оба соја, те омогућила једнака старост лутки мужјака у тренутку стерилизације.



Сл. 74 Филтер хартије са јајима LAB соја *Ae. albopictus*

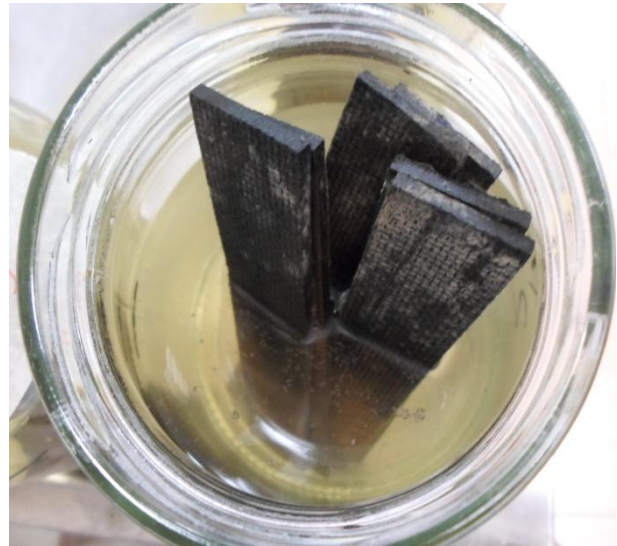


Сл. 75 Шпатуле са јајима WILD соја *Ae. albopictus*

(Оригинал)

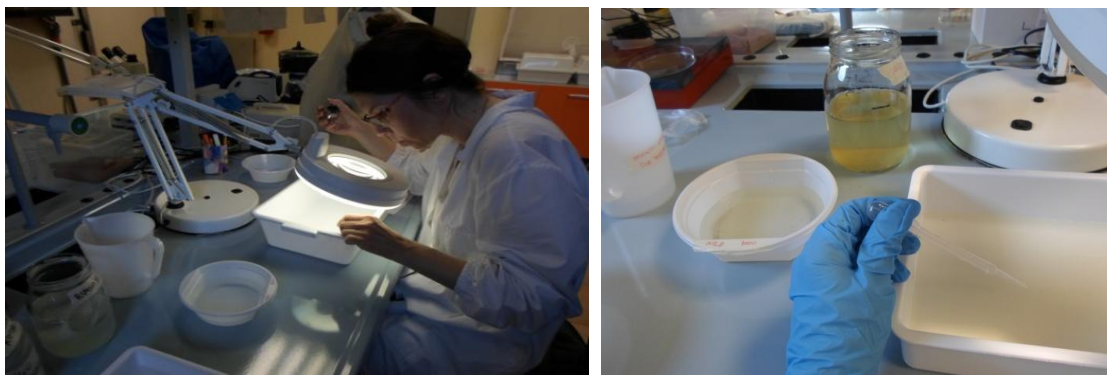


Сл. 76 Ларве првог ступња (L1) LAB соја  
24 сата након пиљења  
(тачкице на површини воде)



Сл. 77 Ларве првог ступња (L1) WILD соја  
24 сата након пиљења  
(крупније су од L1 LAB соја услед бржег развоја)  
(Оригинал)

Наредног дана, након пиљења, ларве првог ступња (L1) LAB и WILD сојева су пипетиране и избројане (Сл. 78, 79, 80 и 81), те премештене у засебне беле правоугаоне пластичне кадице (30 x 21 x 8 cm) (Сл. 82) и гајене у густини од 2 ларве/ml дејонизоване воде (2000 ларви/литру дејонизоване воде/кадици) (Сл. 83). Укупно су коришћене четири кадице (по две за сваки од сојева). Током наредна четири дана ларвама је обезбеђена исхрана IAEA\_BY течном храном (3,2 % wt:vol) (50% брашна од туне, 36% говеђе јетре у праху, 14% пивског квасца у праху, и мешавине витамина 0,2 g у 100 ml течне хране) у просечној количини од 0,5 mg/ларви/дану (0,2; 0.4; 0.6; 0.8 mg/ларви/дану од првог до четвртог дана). Ларве су гајене у контролисаним условима (температура: 30±1°C, RH: 80% и фотопериод 12:12 часова светлости/таме).



Сл. 78 и 79 Процедура бројања и пипетирања ларви првог ступња LAB и WILD сојева  
(Оригинал)



Сл. 80 и 81 Пипетиране L1 оба соја

Сл. 82 L1 LAB и WILD у  
кадицама за гајење

(Оригинал)

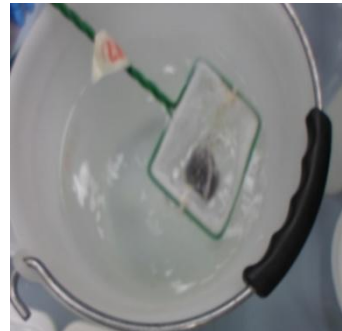


Сл. 83 Гајење ларви: 2000 ларви/литру дејонизоване воде/кадици. По две кадице за сваки од сојева

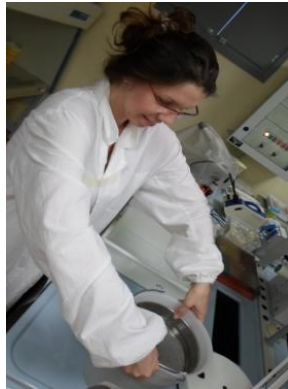
(Оригинал)

#### 4.2.4. Раздвајање полова у стадијуму лутке

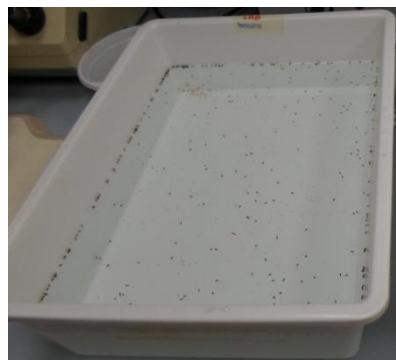
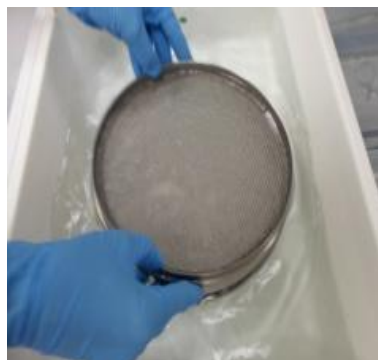
Да би се раздвојили полови и што боље искористили протандрија (особина да се мужјаци развијају брже од женки, те раније почињу са улуткавањем) и полни диморфизам *Ae. albopictus* (који се огледа и у различитој величини мушких и женских јединки лутке мужјака су по правилу ситније (Сл. 94 и 97)), 24 сата након почетка улуткавања (када већину улутканих јединки чине мужјаци) примењена је техника „просејавања“. Она подразумева механички систем сепарације полова путем употребе калибрисаног округлог металног сита (пречинка 20 cm и висине 6 cm) са мрежом чија су квадратна окца 1400 микрона (Giuliani®) (Сл. 84) (Bellini et al. 2007). Лутке и ларве су прво сакупљене акваријумском мрежицом из кадица за гајење и премештене у кофе са водом загрејаном на 34 °C (Сл. 85, 86 и 87), те нежно промешане пипетом (да би се спречило да остану приљубљене за кофу). Затим је у кофу потопљено сито, где је остало током наредна три минута (Сл. 88). У том периоду су лутке одређене величине (довољно мале, које би по правилу требало да буду мушке) пролазиле кроз окца на сити условљене потребама за дисањем (пошто узимају атмосферски кисеоник) и стимулисане виском температуром воде (Сл. 89 и 90). Током процеса „просејавања“ мехурићи ваздуха који су се формирали на мрежи сита били су одстрањивани пипетом, у циљу онемогућавања лутки да из њих узимају кисеоник те да услед тога не пролазе кроз сито. Све лутке које су прошле кроз сито (тзв. „просејане“ лутке) биле су премештене у кадицу са дејонизованом водом (Сл. 91 и 92), те пребројане, да би након тога била извршена додатна провера њиховог пола под стереомикроскопом (што је осигуравало да ће само лутке мужјака бити издвојене и надаље процесуиране) (Сл. 93). Ова верификација се заснивала на још једној карактеристици полног диморфизма лутки *Ae. albopictus* манифестованој кроз облик и дужину гениталних лобуса мужјака и женки (Сл. 94, 95 и 96). Потом је регистрован и број лутки женки које су прошле кроз сито (да би се могао израчунати проценат резидуалних женки у узорку - што је веома важан податак када се планира примена SIT-а у природним условима), које су након тога елиминисане. Лутке мужјака и женки које нису прошле кроз сито, као и ларве које су евентуално прошле кроз сито биле су реинтродуковане у колонију (у одговарајућу кадицу за гајење). Поступак је примењен посебно за сваки од сојева.



Сл. 84 Калибрисано метално сито    Сл. 85 Сакупљање ларви    Сл. 86 Премештање ларви  
и лутки акваријумском мрежицом    и лутки у кофу  
(Оригинал)



Сл. 87 Ларве и лутке    Сл. 88 Постављање сита    Сл. 89 „Пресејавање“  
у загрејаној води    у кофу    током 3 min  
(Оригинал)



Сл. 90 „Пресејане“ лутке    Сл. 91 Премештање    Сл. 92 „Пресејане“ лутке  
„пресејаних“ лутки у кадице    пре провере пола и бројања  
(Оригинал)



Сл. 93 Додатна провера пола лутки под стереомикроскопом



Сл. 94 Лутке *Ae. albopictus* (мужјак – лево, женка – десно)

(Оригинал)



Сл. 95 Генитални лобуси лутке мужјака *Ae. albopictus*



Сл. 96 Генитални лобуси лутке женке *Ae. albopictus*

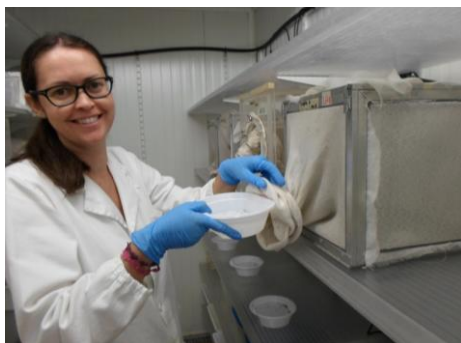
(Оригинал)



Сл. 97 Лутке мужјака (плава стрелица) и женки (црвена стрелица) на површини воде, поглед одозго (лутке женки су крупније (Извор: <https://www.alamy.com>)

Један дан након процедуре „просејавања“ лутки мужјака и њихове верификације, лутке женки су мануелно сакупљене пипетирањем из кадица за гајење. Ова сепарација се такође базирала на полном диморфизму *Ae. albopictus* односно на различитој величини лутки мужјака и женки (Сл. 97), те су биране крупније јединке које би по правилу требало да буду женке. Пол одвојених лутки је додатно проверен под стереомикроскопом, да би

потом било издвојено 400 лутки женки које су интродуковане у четири мала кавеза (100 лутки женки/кавезу) (Сл. 98 и 99) односно по два кавеза за сваки од сојева. Након тога су припремљена још два кавеза (по један за сваки сој) у које је смештено по 50 додатних лутки женки (које су служиле као резерва за замену евентуално угинулих женки пре њихове интродукције у експерименталне тунеле). Сви кавези су смештени у комору са контролисаним условима (температура:  $28\pm 1^\circ\text{C}$ , RH: 80% и фотопериод 14:10 часова светлости/таме) током наредна три дана. Након излетања одраслим женкама је за исхрану понуђен 10% раствор шећера *ad libitum*.



Сл. 98 Интродукција лутки женки у четири кавеза (100 лутки /кавезу)



Сл. 99 Лутке женки у кавезу

(Оригинал)

#### 4.2.5. Процедура ирадијације лутки мужјака

Након што су све одвојене лутке мужјака (оба соја) достигле старост од 36-40 часова, смештене су у четири адекватно обележене пластичне посуде (2 посуде/соју, од којих је једна била намењена луткама које ће бити стерилисане, а друга луткама које ће остати фертилне) (Сл. 100), те транспортоване (око сат времена) из узгајалишта на ирадијацију у болницу S. Anna Hospital, Department of Health Physic, Ферара (Италија). Иако половина „просејаних“ лутки мужјака није требало да буде подвргнута ирадијацији, оне су ипак транспортоване до објекта ирадијације, чиме су се свим луткама мужјака које ће учествовати у експерименту обезбедили једнаки животни услови (који укључују и евентуално негативан утицај транспорта).

За потребе ирадијације коришћен је IBL 437 ирадијатор (CIS Bio International, Bagnols-sur Cèze, France) са линеарним извором зрачења  $^{137}\text{Cs}$  (радиоактивни изотоп Caesium-137)

(Balestrino et al. 2010). Лутке мужјака које је требало стерилисати премештене су у две адекватно обележене Петри посуде (по једна за сваки сој) (Сл. 101 и 102), које су потом смештене у средишњи део (где је најуниформнија доза зрачења) специјалног цилиндра (пречника 13 cm, висине 29 cm, запремине 3.8 литара), који се користи у процесу ирадијације (Сл. 103, 104 и 105). Цилиндар је интродукован у ирадијатор (Сл. 106) у коме су лутке мужјака стерилисане са 30 Gy у току периода од 15 минута (коригованом према трошењу радиоактивног извора).



Сл. 100 Припрема лутки мужјака за транспорт  
(за сваки сој се носе по две посуде)

Сл. 101 Премештање лутки мужјака  
у Петри посуде (пре стерилизације)

(Оригинал)



Сл. 102 Лутке мужјака  
припремљене за стерилизацију

Сл. 103 и 104 Смештање Петри посуде са луткама мужјака  
у средишњи део специјалног цилиндра

(Оригинал)





Сл. 105 Специјални цилиндар са Петри посудама са луткама мужјака



Сл. 106 IBL 437 ирадијатор (са линеарним извором зрачења  $^{137}\text{Cs}$ ) у кога је интродукован цилиндар са луткама мужјака које ће бити подвргнуте ирадијацији од 30 Gy (Оригинал)

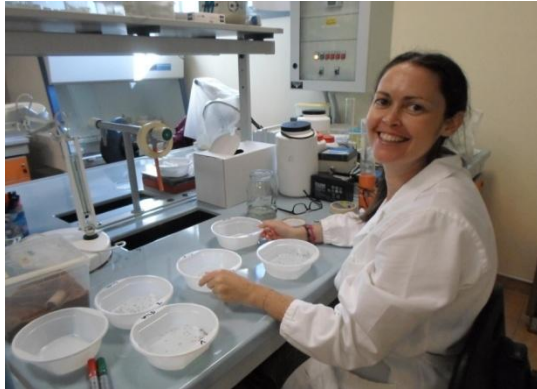
#### 4.2.6. Операције у тунелима

##### - Интродукција лутки мужјака

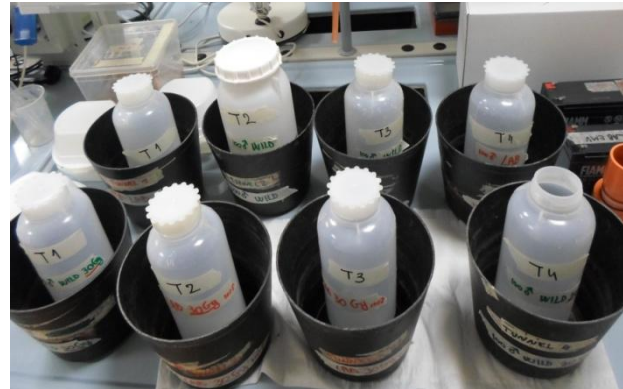
Одмах након ирадијације, лутке мужјака су транспотоване назад до узгајалишта, где је одговарајући број стерилисаних и фертилних јединки оба соја насумично изабран и адекватно распоређен (Сл. 107). Према експерименталном протоколу, за један сет тестирања у третману (тј. све четири комбинације) било је потребно издвојити укупно 800 лутки мужјака односно за сваки од сојева по 200 стерилисаних и 200 нестерилисаних (фертилних) лутки мужјака (Табела 2).

Издвојене лутке су потом смештене у претходно адекватно обележене затворене пластичне посуде (са 0,7 литара воде) у циљу што безбеднијег транспорта до експерименталних тунела (Сл. 108). Такође су припремљене и црне пластичне кантице (запремине 3 литра) које ће служити за интродукцију лутки мужјака у тунеле (100 лутки мужјака/кантици, и две кантице/тунелу). Свака кантица је била адекватно обележена у складу са сојем (LAB или WILD) и статусом (стерилисане или фертилне) лутки мужјака

које ће у њу бити смештене, као и тунелом у који ће бити интродуковане (Сл. 108). Лутке мужјака су премештене из посуда за транспорт у одговарајуће црне кантице непосредно пре интродукције у тунеле (Сл. 109 и 110) а у сваки од тунела је у засебним кантицама смештено по 100 стерилисаних мужјака једног соја и 100 фертилних мужјака другог соја.



Сл. 107 Бројање и сортирање стерилисаних и фертилних лутки мужјака након повратка у узгајалиште



Сл. 108 Адекватно обележене посуде за транспорт лутки мужјака и одговарајуће кантице за интродукцију у тунеле

(Оригинал)

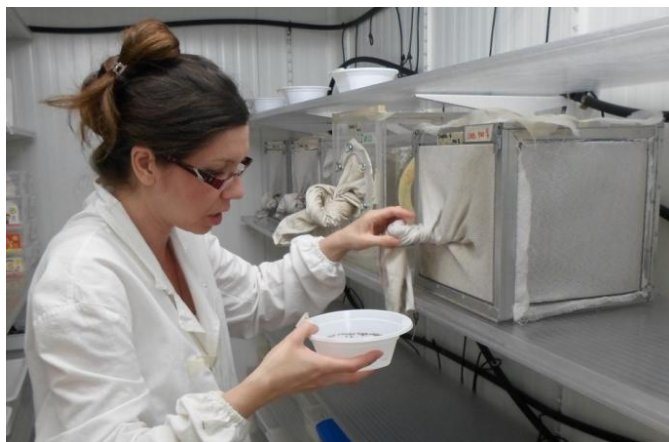


Сл. 109 и 110 Припремљене кантице са стерилисаним и фертилним луткама мужјака и њихова интродукција у тунеле (у сваки од тунела је у засебним кантицама смештено по 100 стерилисаних мужјака једног соја и 100 ферилних мужјака другог соја)

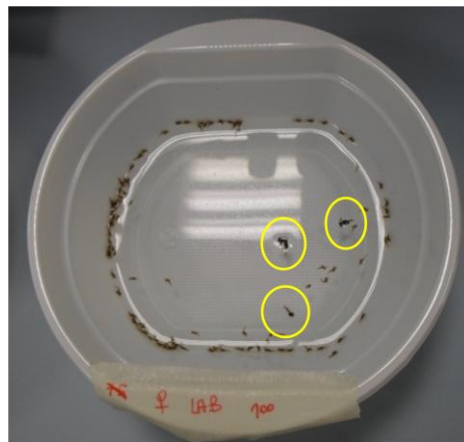
(Оригинал)

- Интродукција женки

Три дана након што је извршена сепарација лутки женки и њихова интродукција у кавезе смештене у комору са контролисаним условима, угинуле женке (без обзира да ли су угинуле у стадијуму лутке или одраслог) (Сл. 111 и 112), замењене су адекватним бројем живих јединки (аспирираним из додатних кавеза) (Сл. 113, 114 и 115), да би у сваки тунел било интродуковано по 100 одраслих женки (како налаже експериментални протокол).

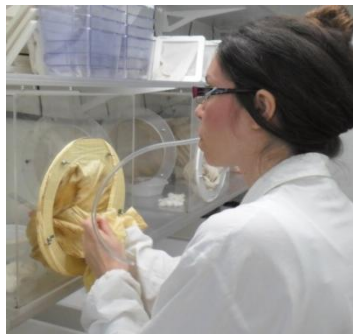


Сл. 111 Провера морталитета женки

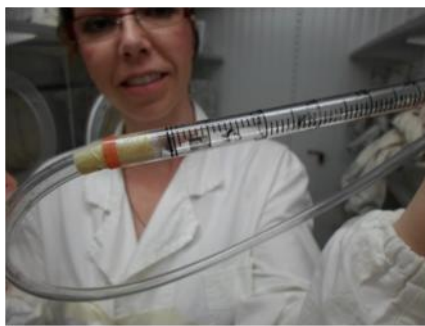


Сл. 112 Бројање свих угинулих женки  
(укључујући и лутке и одрасле)

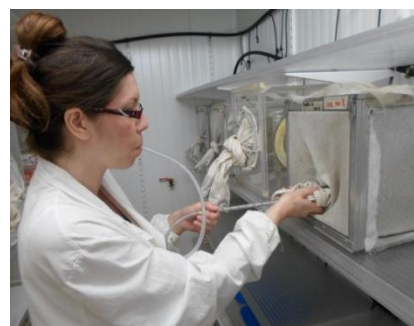
(Оригинал)



Сл. 113 Аспирација женки  
из додатног кавеза



Сл. 114 Аспириране резервне  
женке (одговарајућег  
соја) из додатног кавеза



Сл. 115 Интродукција резервних  
женки у експериментални кавез

(Оригинал)

Потом су кавези са по 100 одраслих неспарених женки (Сл. 116) интродуковани у тунеле (1 кавез/тунелу, сој је био одређен у складу са експерименталним протоколом) (Сл. 117), отворени и нежно протрешени да би се поспешио излазак женки (Сл. 118). Отворени кавези су остављени у тунелима (Сл. 119) до провере тзв. почетног морталитета (три дана касније). Раствор шећера је одстрањен из кавеза, а неспарене женке су, према експерименталном протоколу, интродуковане у тунеле три дана касније од лутки мужјака, да би сви мужјаци који пређу у адулте имали довољно времена за ротацију терминалних сегмената, те постану спремни за парење (односно да би се избегао утицај радијацијски-индукованог превременог излетања и полног сазревања стерилисаних мужјака) (Bellini et al., 2013b).



Сл. 116 Кавез са 100 неспарених женки  
(Оригинал)



Сл. 117 Интродукција кавеза са неспареним  
женкама у тунел



Сл. 118 Отворен кавез треба благо протрести  
да би се поспешио излазак женки



Сл. 119 Отворен кавез остаје у тунелу до  
провере морталитета (три дана касније)

- Провера почетног морталитета, крвни оброк и интродукција овипозиционих клопки

Шест дана након интродукције лутки мужјака три дана након интродукције одраслих женки у тунеле, извршена је провера морталитета (тзв. почетни морталитет). Важно је напоменути да се термин „почетни морталитет“ односи искуључиво на читавање морталитета јединки које су интродуковане у тунеле и пружа нам драгоцене податке како о квалитету отпуштених мужјака, тако и о броју живих женки током понуђеног крвног оброка (што су веома важне информације приликом тумачења резултата, о чему ће бити више речи у поглављу: Дискусија, Оглед II).

Да би се утврдио почетни морталитет мужјака, садржај црне кантице (која је служила за интродукцију лутки мужјака) је пресут у белу кадицу ради лакшег читавања (Сл. 120), те су регистроване све угинуле јединке (и лутке и одрасли који су угинули током или након еклозије) (Сл. 121). Свака кантица је прегледана засебно, да би се обезбедили подаци за поређење почетног морталитета мужјака различитих сојева (LAB, WILD) и различитог статуса (стерилисани, фертилни). Почетни морталитет женки је регистрован у кавезима који су служили за њихову интродукцију (Сл. 122).



Сл. 120 Процедура утврђивања морталитета мужјака (пресипање садржаја кантице за интродукцију мушких лутки у белу кадицу)      Сл. 121 Регистровање угинулих мужјака (и лутки и одраслих)

(Оригинал)



Сл. 122 Утврђивање морталитета женки  
(Оригинал)

Истог дана, непосредно након очитавња почетног морталитета, у периоду између 16 и 17 часова, женкама је понуђен крвни оброк. Волонтери су стајали мирно у тунелу допуштајући женкама да се неометано хране њиховом крвљу (Сл 123) (што је у просеку трајало око 20 min/тунелу). У сваком тунелу је регистрован број женки које су узеле крвни оброк (односно стопа исхране крвљу, изражена у процентима) да би се касније могао израчунати просечан фекондитет/женки у односу на укупан број положених јаја у овипозиционим клопкама/тунелу.



Сл. 123 Волонтери у екперименталном тунелу –извор крвног obroка женкама  
*Ae. albopictus* (Оригинал)

Након тога су у углове сваког тунела, на земљу, постављене по четири овипозиционе клопке (са водом и са по три дрвене шпатуле које су служиле као овипозициони супстрат) (Сл. 125 и 126). Све овипозиционе клопке и дрвене шпатуле су претходно обележене у складу са тунелом у који ће бити интродуковане (Сл. 124).



Сл. 124 Овипозиционе клопке и дрвене шпатуле обележене у складу са тунелом у који ће бити постављене



Сл. 125 Припремљене четири овипозиционе клопке (пре интродукције у тунел бр. 2)

(Оригинал)



Сл. 126 Овипозиционе клопке, постављене у углове сваког тунела (4/тунелу)



Сл. 127 Овипозициона клопка, непосредно пре сакупљања из тунела

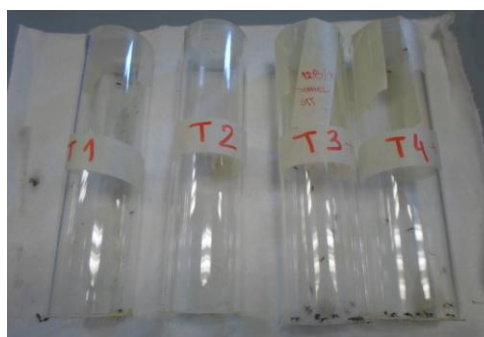
(Оригинал)

- Аспирирање одраслих и сакупљање овипозиционих клопки

Осам дана након крвног оброка, из тунела су аспирирани сви преостали комарци (Сл. 128, 129 и 130), замрзнути (Сл. 131), сортирани по полу и пребројани. Ови подаци су важни за одређивање крајњег броја преживелих адулта, те израчунавање дневне стопе преживљавања (посебно за мужјаке, посебно за женке) и испитивање могућих корелација са метеоролошким факторима. Истог дана су из тунела сакупљене овипозиционе клопке (Сл. 127 и 132), које ће потом бити анализане у лабораторији.



Сл. 128 Аспирирање преосталих комараца



Сл. 129 Аспирирани комарци из сваког тунела



Сл. 130 Аспирирани комарци пре замрзавања



Сл. 131 Замрзавање комараца



Сл. 132 Сакупљене овипозиционе клопке  
(Оригинал)



#### 4.2.7. Одређивање броја јаја по тунелу, фекондитет женки и стопа фертилитета јаја

Дрвене шпатуле са положеним јајима су одстрањене из овипозиционих клопки и стављене на сушење у лабораторијске услове током шест дана (Сл. 133). Да би се омогућило пиљење јаја (у складу са већ описаном процедуром) по 12 шпатула из истог тунела смештено је у три посебне тегле (4 насумично одабране шпатуле/тегли). Процедура је поновљена за сваки од експерименталних тунела (Сл. 134).



Сл. 133 Процес сушења дрвених шпатула са јајима, у лабораторијским условима

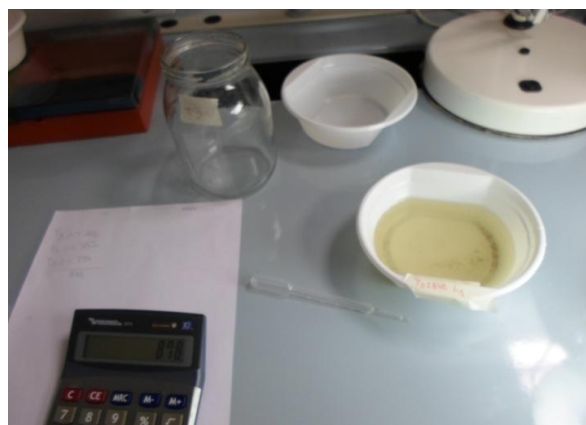


Сл. 134 Процедура пиљења

(Оригинал)



Сл. 135 Дрвене шпатуле се одстрањују из тегли након пиљења



Сл. 136 Бројање испиљених ларви првог ступња

(Оригинал)

Наредног дана дрвене шпатуле су извађене из тегли (Сл. 135), те поново стављене на сушење да би се обезбедила што боља уочљивост јаја *Ae. albopictus*, која је неопходна приликом њиховог бројања. У међувремену је, путем пипетирања, регистрован број испиљених ларви (L1) по сваком тунелу (Сл. 136) што је служило за касније упоређивање са бројем испиљених јаја избројаних на шпатулама из истог тунела и представљало је врсту провере. Бројање јаја на дрвеним шпатулама било је изведено под стереомикроскопом (Сл. 137).

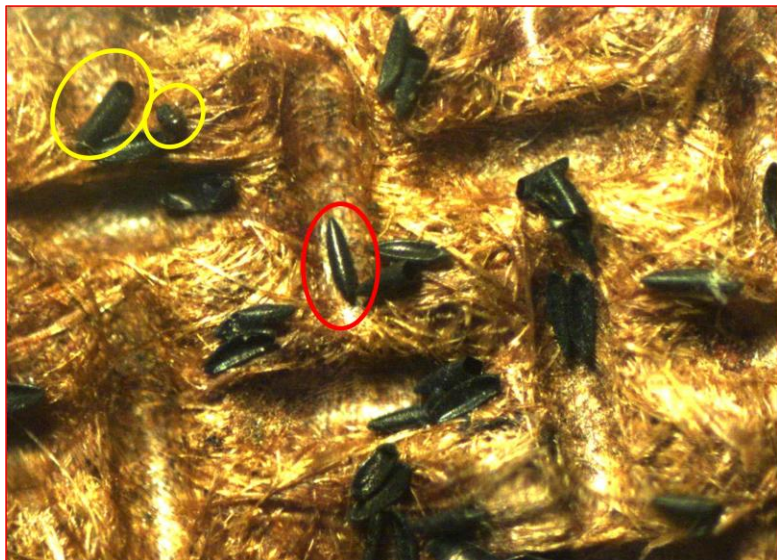
Да би се одредила стопа фертилитета јаја, засебно је бележен број испиљених и неиспиљених јаја (Сл. 138) положених на свих 12 шпатула из једног тунела, а њихов збир је представљао укупан број јаја по тунелу.

Сва неиспиљена јаја била су додатно прегледана ентомолошким иглом, да би се утврдило да ли је оперкулум заиста затворен или је можда пао назад након пиљења ларве. Стопа фертилитета јаја (процент пиљења јаја)/тунелу је израчуната као однос броја испиљених јаја и укупног броја положених јаја/тунелу, помножен са 100.

Просечан фекондитет женке/тунелу (број јаја по крвљу нахрањеној женки/тунелу) је израчунат као однос укупног броја положених јаја/тунелу и броја женки које су узеле крвни оброк.



Сл. 137 Бројање јаја



Сл. 138 Испиљено јаје и његов оперкулум (заокружено жутом линијом) и неиспиљено јаје (заокружено црвеном линијом)

(Оригинал)

#### 4.2.8. Резидуални фертилитет

Додатни део експеримента представљало је израчунавање резидуалног фертилитета стерилисаних мужјака у лабораторијским условима (тзв. стерилна контрола), пошто је тај податак неопходан за израчунавање Fried Index-а (Индекс компетитивности мужјака).

Резудални фертилитет је добијен израчунавањем процента испиљених јаја (стопе фертилитета јаја) након парења 100 стерилисаних мужјака и 100 фертилних неспарених женки LAB (Rimini) соја (који су потицали из истих група јединки, као и комарци коришћени у експерименталним тунелима током третмана) и који су у стадијуму лутке били интродуковани у мали лабораторијски кавез. Комарци су гајени у контролисаним условима (температура:  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , RH: 80% и фотопериод 14:10 часова светлости/таме). Након излетања, адултима је за исхрану понуђен 10% раствор шећера *ad libitum*, док су женке добиле један крвни оброк (седам дана након интродукције лутки). Два дана након крвног obroка у кавез су постављене две чаше за полагање јаја, током наредних пет дана. Потом су филтер хартије са јајима сакупљене, осушене и скениране, а јаја су преборајана аутоматски помоћу софтвера ImageJ. Након тога јаја су стављена на пиљење по стандардној процедури (Bellini et al. 2007), те је путем пипетирања регистрован број испиљених ларви. Стопа фертилитета јаја (процент пиљења јаја) је израчуната као однос броја испиљених ларви и броја регистрованих јаја, помножен са 100.

Овај поступак је изведен приликом сваког од седам периода тестирања у треману, а вредност резидуалног фертилитета стерилисаних мужјака, коришћена у формули за израчунавање Fried Index-а, представљала је просечну вредност свих тестирања и износила је 2,82 %.

#### 4.2.9. CIS и Fried индекси

- Израчунавање Индекса капацитета за индуковање стерилитета - CIS Index (Capacity to Induce Sterility Index) извршено је на основу следеће формуле (Bellini et al. 2013b):

$$\text{CIS Index} = (N/S) \times [(H_n - H_o)/H_o]$$

N - број отпуштених фертилних мужјака у огледном тунелу у коме се мери компетитивност

S - број отпуштених стерилних мужјака у огледном тунелу у коме се мери компетитивност

H<sub>n</sub> - проценат пиљења јаја у контролном тунелу

H<sub>o</sub> - проценат пиљења јаја у огледном тунелу у коме се мери компетитивност (третман)

- Израчунавање индекса компетитивности мужјака – Fried's Competitiveness Index извршено је на основу следеће формуле (Bellini et al. 2013b):

$$\text{Fried Index} = (N/S) \times [(H_n - H_o)/(H_o - H_s)]$$

N - број отпуштених фертилних мужјака у огледном тунелу у коме се мери компетитивност

S - број отпуштених стерилних мужјака у огледном тунелу у коме се мери компетитивност

H<sub>n</sub> - проценат пиљења јаја у контролном тунелу

H<sub>o</sub> - проценат пиљења јаја у огледном тунелу у коме се мери компетитивност (третман)

H<sub>s</sub> - резидуални фертилитет стерилних мужјака у лабораторији

#### **4.2.10. Метеоролошки фактори**

У циљу испитивања утицаја различитих метеоролошких фактора на преживљавање (односно дневну стопу преживљавања) адулта у тунелима током свих 11 периода извођења експеримента, прикупљени су званични подаци о различитим температурним параметрима и релативној влажности ваздуха (RH) (са сајта “Global climate data”: <https://en.tutiempo.net/climate>) за Borgo Panigale (предграђе Болоње удаљено ваздушном линијом 24,08 km од Crevalcore-а где је извођен експеримент).

Вредности метеоролошких фактора (у оквиру истог периода тестирања) израчунате су посебно за мужјаке, а посебно за женке, пошто су мужјаци (у касном стадијуму лутке) интродуковани у тунеле три дана пре интродукције одраслих женки, те су као адулти у тунелима боравили 14, а женке 12 дана (до момента када су аспирирани).

За сваки од периода тестирања су осим израчунавања просека одређених фактора (средња, максимална и минимална дневна температура, средња дневна RH), регистроване и апсолутна максимална и минимална температура.

Осим тога, да би се испитао евентуални утицај температурних параметера (средња, максимална и минимална дневна температура) на почетни морталитет мужјака израчунате су и просечне вредности поменутих температурних параметара за првих 6 дана (тј. од интродукције лутки мужјака до читавања почетног морталитета) током свих 11 периода извођења експеримента.

#### **4.2.11. Дневна стопа преживљавања**

Да би се могла одредити дневна стопа преживљавања („daily survival rate“ –SR) оба пола комараца, потребно је имати информације о броју иницијално интродукованих мужјака и женки, као и о броју преживелих јединки на крају експеримента, те о дужини трајања огледа (при чему се дан интродукције јединки рачуна као нулти дан). Осим тога, у току трајања оваквог типа експеримента треба вршити и повремена читавања морталитета, а што је таквих читавања више, то ће вредност израчунате SR бити прецизнија. Експериментални протокол овог огледа, подразумевао је регистровање броја уинулих/преживелих јединки у два наврата (током читавања почетног морталитета и током аспирирања преживелих јединки на крају експеримента).

Израчунавање стопе дневног преживљавања јединки изведено је за сваки тунел по периоду и то посебно за сваки пол и подразумевало је следеће кораке:

1. регистровање броја преосталих живих јединки (одређеног пола):

- на дан читавања почетног морталитета (подаци су добијени разликом између броја интродукованих јединки и броја констатованих уинулих јединки) и
- на дан аспирирања (број аспирираних јединки)

2. за сваки од та два броја регистрованих живих јединки (тј. током поменуто два наврата) израчунат је природни логаритам:  $\ln(x)$ , који је придружен одговарајућем дану (који се рачуна почев од нултог дана интродукције) када је регистрован податак

3. на основу тих података тј. дана регистрација живих јединки и вредности израчунатог природног логаритма (броја регистрованих живих јединки), креиран је графикон линеарног тренда који, одговара једначини линеарног тренда формата:  $y=bx+a$ . Слово "b" - представља вредност нагиба линеарног тренда док нам његов предзнак говори да ли је тренд испитиване појаве растући или опадајући; слово "a" - је одсечак на ординати (константа) која одговара просечној оцењеној вредности зависне варијабле "y" када је вредност независне варијабле "x" једнака нули; а "x" у овој једначини представља одређени временски тренутак (тј. дан) у коме се врши читавање

4. Вредност дневне стопе преживљавања комараца добијена је израчунавањем експоненцијалне вредности поменуте вредности нагиба линеарног тренда "b" приказане у једначини линеарног тренда (тј.  $SR = \text{EXP}(b)$ ), :  $SR = e^b$ .

#### **4.2.12. Статистичка обрада добијених резултата**

Сви подаци су анализирани у програму Statistica 12.6, изузев вероватноће појаве женки у „просејаном“ узорку (која је анализирана у програму „R“) и израчувања дневне стопе преживљавања (које је изведено у програму Microsoft Office Excel).

Приликом утврђивања значајности разлика у оквиру посматраних сетова података прво су тестиране претпоставке о нормалности дистрибуције (Shapiro-Wilk тест) и о хомогености варијанси (Levene's тест) испитиваних сетова података, да би се дефинисало да ли треба применити параметарске или непараметарске тестове.

Сетови података који су задовољили обе претпоставке ( $p>0,05$ ) су потом анализирани применом параметарских тестова. Анализа варијансе (One-way ANOVA) је коришћена за тестирање: броја крвљу нахрањених женки по тунелу и укупног броја положених јаја по тунелу (како између контроле и третмана, тако и искључиво у третману између различитих комбинација сојева); као и стопе фертилитета јаја (али само у оквиру третмана). Пошто групе података анализирани путем ANOVA-е, ни у једном случају нису

показале статистички значајне разлике, није било потребно применити ни један од Пост хок тестова. За поређење почетног морталитета мужјака у третману (за тестирање: LAB стерилисани vs. LAB нестерилисани; и LAB стерилисани vs. WILD стерилисани) коришћен је t-тест.

Сетови података који нису задовољили барем једну од поменутих претпоставки (тј. ако су Shapiro-Wilk тест и/или Levene's тест показали:  $p < 0,05$ ) анализирани су путем непараметарских тестова. Тако је Kruskal-Wallis rank sum тест коришћен при анализи: броја јаја по крвљу нахрањеној женки (тестирање између контроле и третмана, као и искључиво унутар третмана), стопе фертилитета јаја (само тестирање између контроле и третмана), те CIS и Fried Index-а (искључиво у третману пошто је контрола свакако садржана у формулама индекса), праћеног тестом вишеструких поређења на бази рангова (у случају констатованих значајних разлика). Приликом поређења почетног морталитета мужјака у третману коришћени су Mann-Whitney U тест, Kolmogorov-Smirnov тест и Poisson link function log тест (за тестирање: LAB + WILD стерилисани vs. LAB + WILD нестерилисани; WILD стерилисани vs. WILD нестерилисани; и LAB нестерилисани vs. WILD нестерилисани).

Тест поређења пропорција је коришћен приликом поређења почетног морталитета фертилних мужјака из контроле (2012. год) и третмана (2013. + 2014. год), као и током експерименталних година.

За тестирање могуће повезаности а) метеоролошких фактора и стопе преживљавања мужјака и женки; као и б) температурних параметара и почетног морталитета фертилних мужјака коришћена је Пирсонова (Pearson) корелациона анализа.

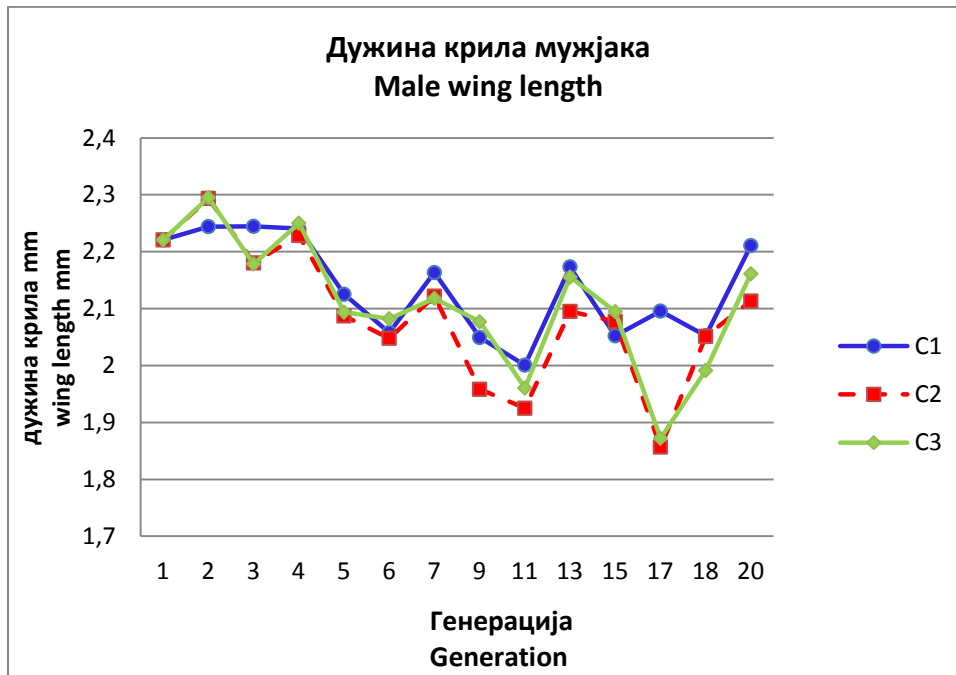
Вероватноћа појаве женки у „просејаном“ узорку за сва три коришћена *Ae. albopictus* соја одређена је логистичком регресијом.

## 5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

### 5.1. Оглед I Испитивање услова масовног узгоја

#### 5.1.1. Дужина крила

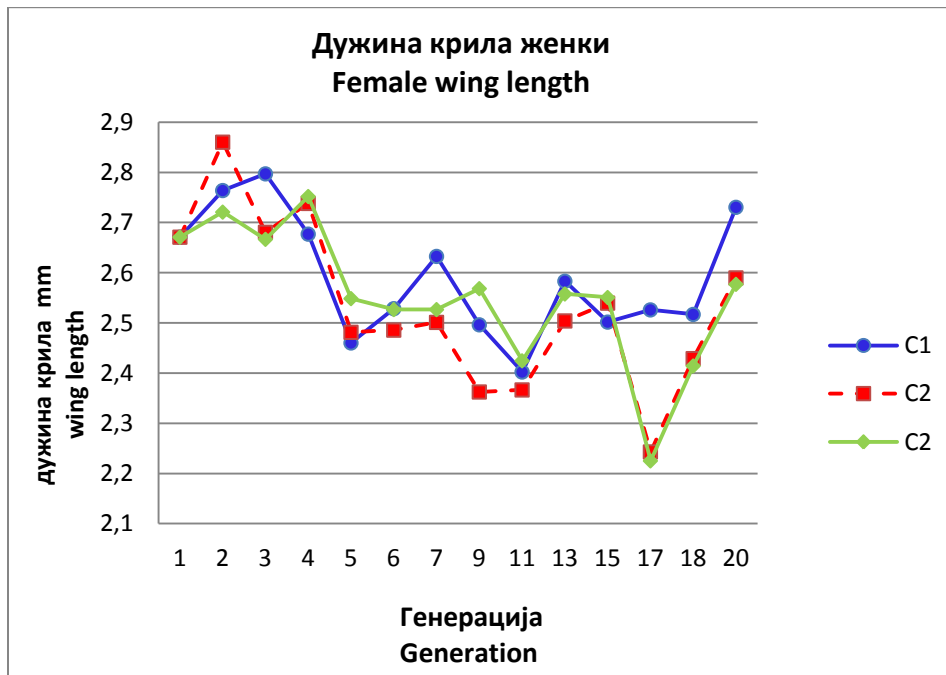
Дужина крила и мужјака и женки показала је изузетна колебања током периода од 20 генерација у свим кавезима, почев од иницијалне тенденције повећања у свим кавезима, праћене опадањем - све до генерације F11, након које је регистрован релативно стабилан пораст све до генерације F20 (Графикони 1 и 2). Поменути пораст је водио до чињенице да се просечна дужина крила генерације F20 приближила вредностима иницијалне популације код оба пола. Ово је било очигледно нарочито у C1, где код мужјака просечна дужина крила ( $2,21 \pm SD 0,09$  mm) није била значајно различита од иницијалне популације ( $2,22 \pm 0,07$  mm), а у случају женки је чак била значајно виша ( $2,73 \pm 0,12$  mm) него код иницијалне популације ( $2,67 \pm 0,07$  mm) ( $p < 0,01$ ).



Графикон 1 Дужина крила мужјака *Aedes albopictus* гајених у три различите величине кавеза (C1, C2, C3) током периода од 20 генерација

Figure 1 Wing length of *Aedes albopictus* males reared in three differently sized cages (C1, C2, C3), during 20 generation period





Графикон 2 Дужина крила женки *Aedes albopictus* гајених у три различите величине кавеза (C1, C2, C3) током периода од 20 генерација

Figure 2 Wing length of *Aedes albopictus* females reared in three differently sized cages (C1, C2, C3), during 20 generation period

Дужина крила комараца оба пола се значајно разликовала између кавеза. Мужјаци гајени у C1 имали су високо значајно дужа крила ( $2,13 \pm 0,09$  mm) у поређењу са мужјацима из C2 ( $2,08 \pm 0,12$  mm) и C3 ( $2,10 \pm 0,11$  mm) ( $p < 0,01$ ) (Табела 3). Статистички високо значајна разлика у дужини крила мужјака је такође уочена и између кавеза C2 и C3 ( $p < 0,01$ ). Слична ситуација је примећена и код женки, где је просечна дужина крила из C1 била највиша ( $2,59 \pm 0,12$  mm) и високо значајно различита од дужине крила женки гајених у C2 ( $2,52 \pm 0,17$  mm) и C3 ( $2,54 \pm 0,14$  mm) ( $p < 0,01$ ). Статистички значајна разлика у дужини крила женки између кавеза C2 и C3 је такође била очигледна ( $p < 0,05$ ). Осим тога, просечна дужина крила свих генерација била је високо значајно виша код женки ( $2,55 \pm 0,14$  mm), него код мужјака ( $2,11 \pm 0,10$  mm) ( $p < 0,01$ ).

Табела 3 Дужина крила (средња вредност  $\pm$  SD) *Aedes albopictus* гајених у три различите величине кавеза током периода од 20 генерација

Table 3 Wing length (mean  $\pm$  SD) of *Aedes albopictus* in three differently sized cages during 20 generations

величина кавеза cage size	ДУЖИНА КРИЛА (mm) WING LENGTH (mm)					
	Мужјаци Males			Женке Females		
	20 генерација 20 generations	први потпериод 1 <sup>st</sup> subperiod	други потпериод 2 <sup>nd</sup> subperiod	20 генерација 20 generations	први потпериод 1 <sup>st</sup> subperiod	други потпериод 2 <sup>nd</sup> subperiod
C1	2,13 $\pm$ 0,09 a	2,14 $\pm$ 0,10 a	2,12 $\pm$ 0,07 a	2,59 $\pm$ 0,12 a	2,59 $\pm$ 0,14 a	2,57 $\pm$ 0,09 a
C2	2,08 $\pm$ 0,12 b	2,11 $\pm$ 0,13 b	2,04 $\pm$ 0,10 b	2,52 $\pm$ 0,17 b	2,56 $\pm$ 0,18 b	2,46 $\pm$ 0,14 b
C3	2,10 $\pm$ 0,11 c	2,13 $\pm$ 0,11 ac	2,06 $\pm$ 0,12 b	2,54 $\pm$ 0,14 c	2,59 $\pm$ 0,11 ac	2,46 $\pm$ 0,15 b

Бројеви у истој колони праћени истим словом нису статистички значајно различити за  $p < 0,05$ ; *Numbers in the same column followed by the same letter are not significantly different for  $p < 0.05$ .*

Анализа тренда дужина крила оба пола у свим кавезима, показала је разлике између два потпериода. До минимума је дошло у генерацији F11, у свим кавезима. У првом потпериоду је у свим кавезима уочен јак негативни линеарни тренд (и код мужјака и код женки), при чему је значајност нагиба регресионих правих била  $p < 0,01/p < 0,05$  у свим случајевима. Иако је током другог потпериода уочен позитиван линеарни тренд у свим кавезима, није се испољила значајност нагиба.

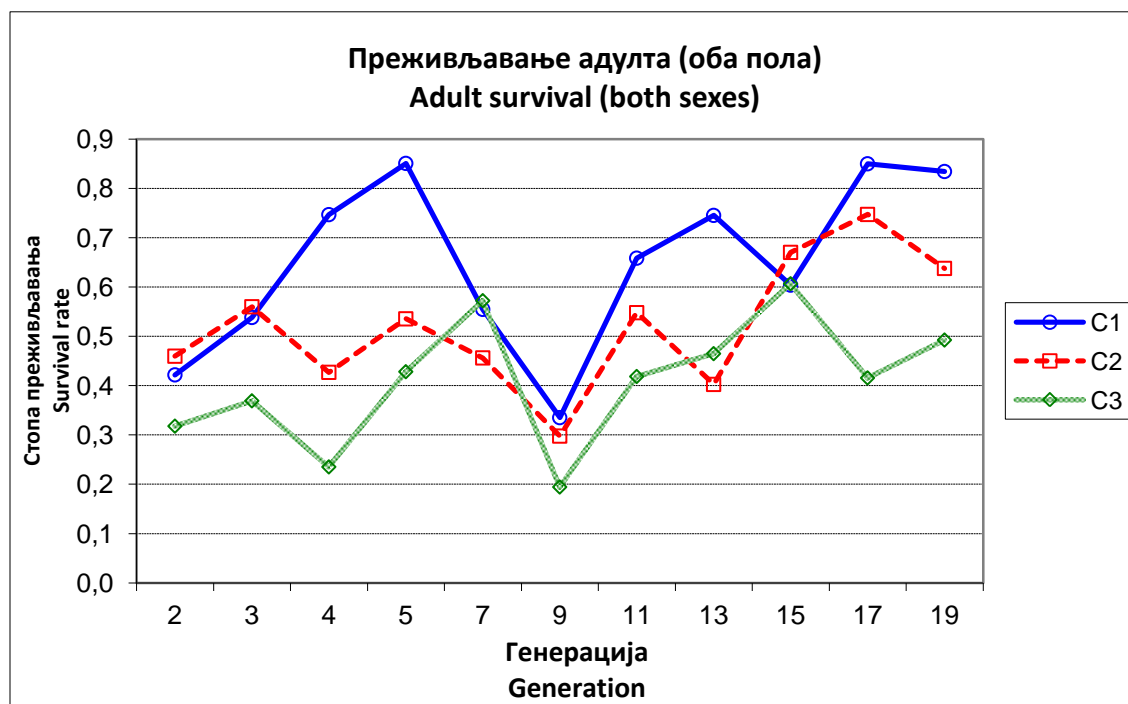
Посматрајући укупан период (током свих 20 генерација) негативни нагиби регресионих правих су били детектовани у свим кавезима и код мужјака и код женки, али су били значајни ( $p < 0,05$ ) само у C2 и C3.

Упркос евидентном позитивном линеарном тренду током другог потпериода, просечне дужине крила биле су краће него у првом потпериоду. Разлике у дужинама крила између првог и другог потпериода биле су најмање изражене у C1 (мужјаци 2,14  $\pm$  0,10 mm и 2,12  $\pm$  0,07 mm; женке 2,59  $\pm$  0,14 mm и 2,57  $\pm$  0,09 mm). Веће разлике су забележене у C2 (мужјаци 2,11  $\pm$  0,13 mm и 2,04  $\pm$  0,10 mm; женке 2,56  $\pm$  0,18 mm и 2,46  $\pm$  0,14 mm) и C3

(мужјаци  $2,13 \pm 0,11$  mm и  $2,06 \pm 0,12$  mm; женке  $2,59 \pm 0,11$  mm и  $2,46 \pm 0,15$  mm). Дужина крила комараца је у првом потпериоду била значајно краћа у C2 vs. C1 и C3 код оба пола ( $p < 0,01$  у оба поређења код мужјака, а у случају женки у C2 vs. C1 ( $p < 0,01$ ) и у C2 vs. C3 ( $p < 0,05$ )). У другом потпериоду и мужјаци и женке гајени у C1 имали су високо значајно дужа крила у односу на C2 и C3 ( $p < 0,01$ ).

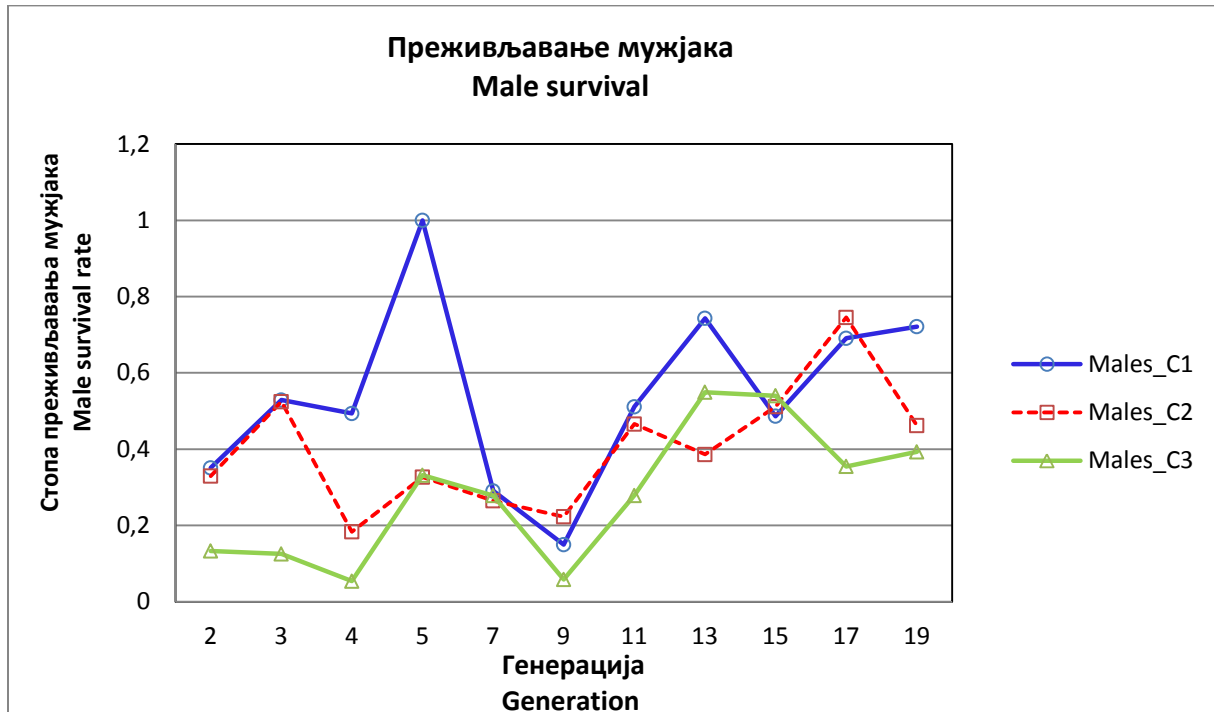
### 5.1.2. Преживљавање адулта

Преживљавање адулта (оба пола) је такође показало иницијални пораст (нарочито у C1), праћен јаким осцилацијама и генералним опадањем до генерације F9, када је уочен минимум у свим кавезима. После тог кључног момента преживљавање адулта је испољило пораст у свим кавезима све до генерације F20, а осцилације су постале мање изражене (Графикон 3). Слична ситуација је примећена код преживљавања мужјака (Графикон 4); док су код женки уочена два минимума: у F9 и у F11, али само у C2 и C3 (док је C1 остао стабилан током тог периода односно периода F9 - F11) (Графикон 5).



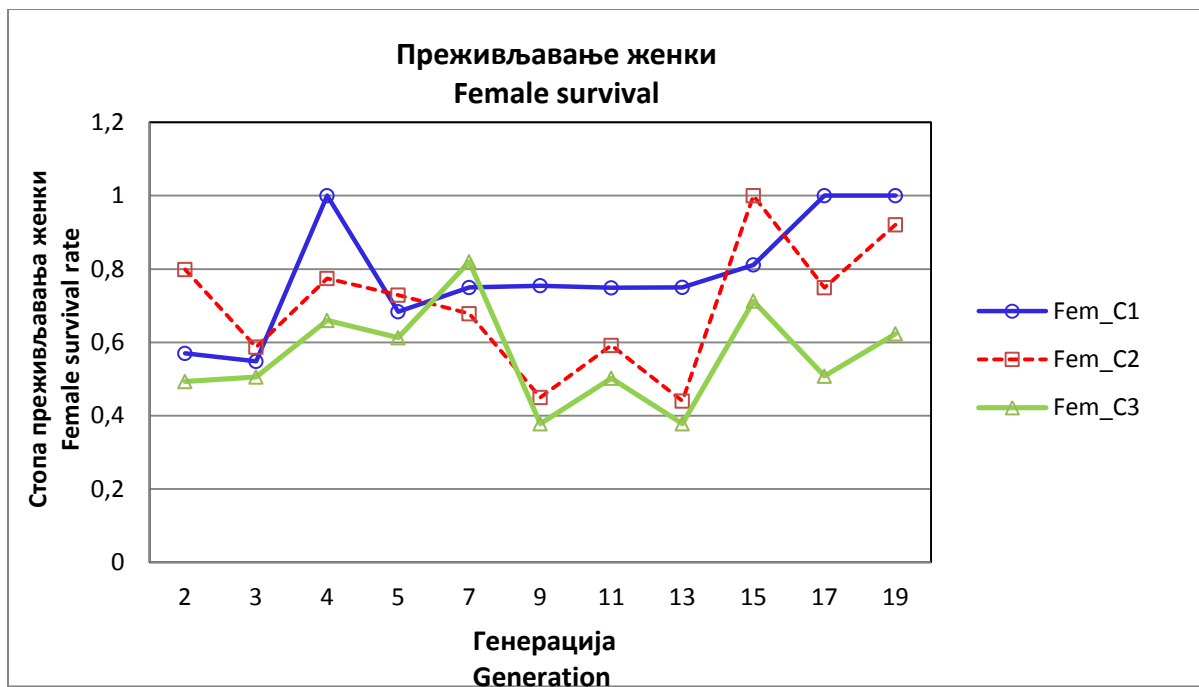
Графикон 3 Стопа преживљавања адулта (оба пола) *Aedes albopictus* гајених у три различите величине кавеза (C1, C2, C3) током периода од 20 генерација

Figure 3 Adult survival rate of *Aedes albopictus* (both sexes) reared in three differently sized cages (C1, C2, C3), during 20 generation period



Графикон 4 Стопа преживљавања мужјака *Aedes albopictus* гајених у три различите величине кавеза (C1, C2, C3), током периода од 20 генерација

Figure 4 Male survival rate of *Aedes albopictus* reared in three differently sized cages (C1, C2, C3), during 20 generation period



Графикон 5 Стопа преживљавања женки *Aedes albopictus* гајених у три различите величине кавеза (C1, C2, C3), током периода од 20 генерација

Figure 5 Female survival rate of *Aedes albopictus* reared in three differently sized cages (C1, C2, C3), during 20 generation period

Укупно преживљавање адулта (током целог периода од 20 генерација) је било највише у C1 (0,64), док је у C2 и C3 било ниже (0,52 и 0,41) – Табела 4. Преживљавање мужјака испољило је сличан образац, и било је навише у C1 (0,54), праћено са C2 (0,40) и C3 (0,28). Просечно преживљавање мужјака у свим кавезима (0,41), било је значајно ниже од преживљавања женки (0,68) ( $p < 0,01$ ). Такође, преживљавање женки показало је сличан тренд у складу са величином кавеза: максимална вредност је забележена у C1 (0,78), средња у C2 (0,70) док је минимална уочена у C3 (0,56). Значајне разлике између кавеза C1 и C3 ( $p < 0,01$ ) примећене су током испитивања укупног преживљавања адулта, преживљавања мужјака и преживљавања женки, мада се у случају преживљавања женки такође испољила и значајна разлика између кавеза C2 и C3 ( $p < 0,05$ ).

Просечне стопе преживљавања адулта у првом потпериоду биле су ниже него у другом потпериоду и то: у С1: 0,57 и 0,74; у С2: 0,46 и 0,60; и у С3 0,35 и 0,48. Ова тенденција је констатована код оба пола у свим случајевима, изузев код женки гајених у С3 где је преживљавање током другог потпериода (0,54) било ниже него током првог (0,58) – Табела 4.

Табела 4 Стопа преживљавања *Aedes albopictus* гајених у три различите величине кавеза током периода од 20 генерација

Table 4 Survival rate of *Aedes albopictus* in three differently sized cages during 20 generations

величина кавеза cage size	СТОПА ПРЕЖИВЉАВАЊА SURVIVAL RATE								
	Адулти Adults			Мужјаци Males			Женке Females		
	20 генерација generations	1. ПП 1 <sup>st</sup> SP	2. ПП 2 <sup>nd</sup> SP	20 генерација generations	1. ПП 1 <sup>st</sup> SP	2. ПП 2 <sup>nd</sup> SP	20 генерација generations	1. ПП 1 <sup>st</sup> SP	2. ПП 2 <sup>nd</sup> SP
С1	0,64 a	0,57 a	0,74 a	0,54 a	0,47 a	0,63 a	0,78 a	0,72 a	0,86 a
С2	0,52 ab	0,46 a	0,60 ab	0,40 ab	0,31 a	0,51 a	0,70 ab	0,67 a	0,74 ab
С3	0,41 b	0,35 a	0,48 b	0,28 b	0,16 a	0,42 a	0,56 c	0,58 a	0,54 b

Бројеви у истој колони праћени истим словом нису статистички значајно различити за  $p < 0,05$ . *Numbers in the same column followed by the same letter are not significantly different for  $p < 0.05$ .*

ПП – потпериод; SP – subperiod

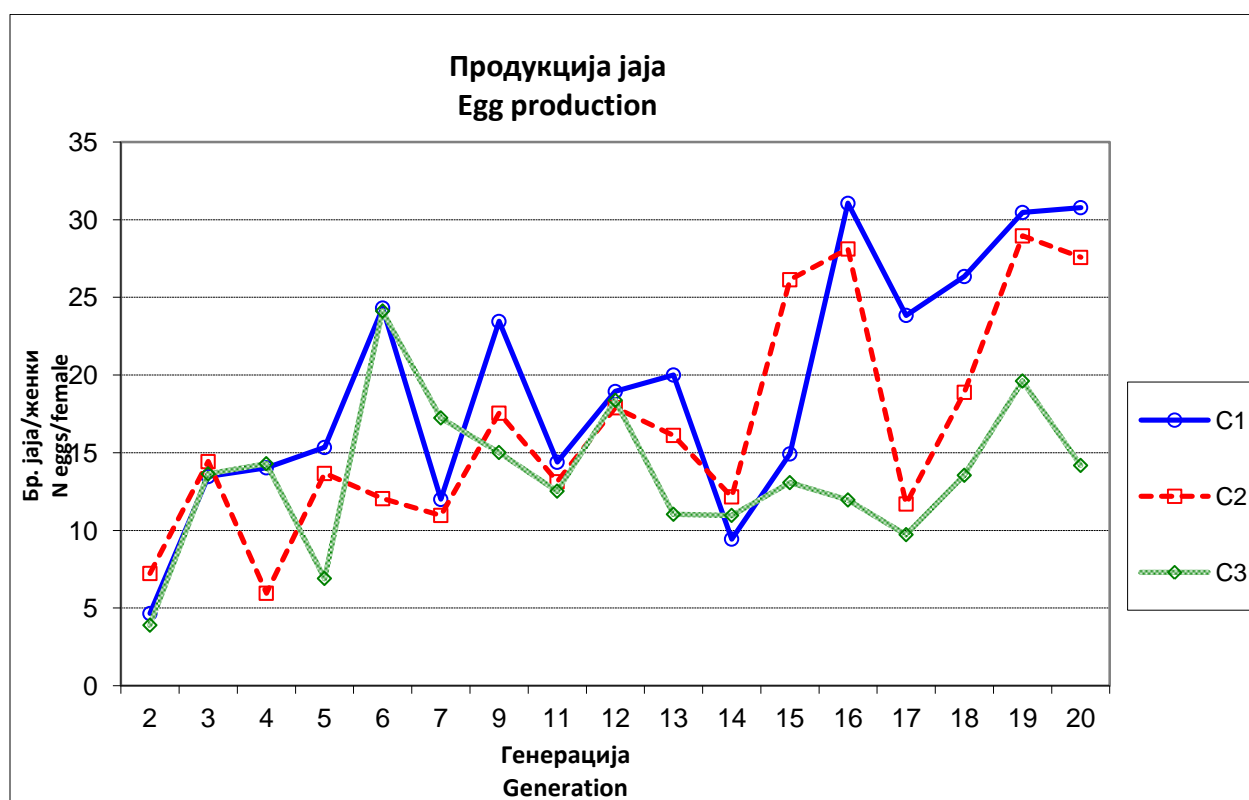
Стопа преживљавања адулта, мужјака и женки током првог потпериода није показала статистички значајне разлике међу кавезима. У другом потпериоду преживљавање је било значајно више у С1 vs. С3 (преживљавање адулта  $p < 0,01$ ; преживљавање женки  $p < 0,05$ ).

Тренд преживљавања је био значајно позитиван ( $p < 0,05$ ) једино у три случаја: у С1 код женки (у целом периоду и другом потпериоду) и у С3 код мужјака (у целом периоду). У свим осталим случајевима у целом периоду и другом потпериоду констатована је позитивна (али не и значајно) линеарна регресија. У првом потпериоду, регресије стопа

преживљавања у кавезима C1 и C2 биле су негативне, али не значајно (и код преживљавања адулта и код преживљавања мужјака), као и у C2 у случају преживљавања женки; док су позитивне регресије (мада не значајно) биле забележене у C3 (код преживљавања адулта, преживљавања мужјака и преживљавања женки) и у C1 код преживљавања женки.

### 5.1.3. Продукција јаја

Број јаја по женки показао је значајан растући тренд током периода од 20 генерација у кавезима C1 и C2, док је у кавезу C3 остао скоро непромењен од самог почетка. Као и у случају претходно описаних параметара, и код продукције јаја су констатоване интензивне флукуације у свим кавезима (Графикон 6).



Графикон 6 Продукција јаја *Aedes albopictus* гајених у три различите величине кавеза (C1, C2, C3) током периода од 20 генерација

Figure 6 Egg production of *Aedes albopictus* reared in three differently sized cages (C1, C2, C3), during 20 generation period

Посматрајући укупан период, продукција јаја није испољила статистички значајне разлике међу кавезима. Ипак, највиша је била у С1 ( $19,26 \pm 7,88$  јаја/женки), затим у С2 ( $16,62 \pm 7,19$ ), док је у С3 била најнижа ( $13,54 \pm 4,73$ ) – Табела 5. Осим тога, анализа тренда продукције јаја је показала да иако је линеарна регресија била позитивна у свим кавезима, статистичка значајност ( $p < 0,01$ ) је констатована само у С1 и С2.

Након што је период од 20 генерација подељен на два потпериода (где је F14 била преломна генерација), установљено је да је током другог потпериода продукција јаја у С3 ( $13,69 \pm 3,30$ ) била значајно нижа него у кавезима С1 ( $26,24 \pm 6,25$ ) и С2 ( $23,57 \pm 6,86$ ) ( $p < 0,01$ ). У истом периоду није било статистички значајне разлике између кавеза С1 и С2. Са друге стране, у првом потпериоду продукција јаја није показала значајне разлике међу кавезима, и била је највиша у С1 ( $15,46 \pm 5,89$ ), праћена са С3 ( $13,46 \pm 5,50$ ) и С2 ( $12,84 \pm 3,81$ ) – Табела 5.

Табела 5 Продукција јаја (средња вредност  $\pm$  SD) *Aedes albopictus* гајених у три различите величине кавеза током периода од 20 генерација

Figure 5 Egg production (mean  $\pm$  SD) of *Aedes albopictus* in three differently sized cages during 20 generations

величина кавеза cage size	Продукција јаја (број јаја/женки) Egg production (number of eggs/female)		
	20 генерација generations	први потпериод 1 <sup>st</sup> subperiod	други потпериод 2 <sup>nd</sup> subperiod
C1	$19,26 \pm 7,88$ a	$15,46 \pm 5,89$ a	$26,24 \pm 6,25$ a
C2	$16,62 \pm 7,19$ a	$12,84 \pm 3,81$ a	$23,57 \pm 6,86$ a
C3	$13,54 \pm 4,73$ a	$13,46 \pm 5,50$ a	$13,69 \pm 3,30$ b

Бројеви у истој колони праћени истим словом нису статистички значајно различити за  $p < 0,05$ ; *Numbers in the same column followed by the same letter are not significantly different for  $p < 0.05$ .*



Значајне разлике у продукцији јаја између периода са вишим (F15–F20) и нижим „приносом“ (F2-F14) констатоване су у кавезима C1 (пораст је износио 10,78 јаја/женки,  $p < 0,01$ ) и C2 (10,73 јаја/женки,  $p < 0,01$ ), док је у C3 та разлика била занемарљива и није била статистички значајна (0,23 јаја/женки).

#### **5.1.4. Паралелизам**

Хомогеност коефицијената правца (тј. нагиба) линеарних трендова испољила се код свих тестираних параметара у свим кавезима, осим у случају продукције јаја у целом периоду, где је уочена статистички значајна хетерогеност коефицијената правца између C3 vs. C1 и C2 ( $p < 0,05$ ).

#### **5.1.5. Корелације**

Изненађујуће, иако је између испитиваних параметара утврђена корелација, она је била статистички значајна само у неколико случајева. Корелација између дужине крила и преживљавања била је значајна једино код мужјака, у кавезу C2 у другом потпериоду и била је врло висока и негативна ( $r = -0,953$ ;  $p < 0,05$ ). Приликом поређења дужине крила и продукције јаја значајна корелација ( $p < 0,05$ ) уочена је само у кавезу C2 у првом потпериоду и код мужјака и код женки, и била је висока и негативна (мужјаци:  $r = -0,745$ ; женке:  $r = -0,751$ ). Корелација између преживљавања и продукције јаја је била значајна једино код женки: у C1 у целом периоду када је била умерена и позитивна ( $r = 0,650$ ;  $p < 0,05$ ), док је у C2 у првом потпериоду била висока и негативна ( $r = -0,881$ ;  $p < 0,05$ ).

## 5.2. Оглед II Испитивање учинка стерилисаних мужјака

### 5.2.1. Почетни морталитет мужјака

У циљу утврђивања постојања статистички значајних разлика у почетном морталитету стерилисаних и нестерилисаних мужјака у третману (тунели са различитим комбинацијама сојева за тестирање конкурентности мужјака), извршено је неколико поређења (Табела 6).

Укупни почетни морталитет мужјака оба соја (LAB (Rimini) + WILD) није показао значајне разлике између стерилисаних (30 Gy) и нестерилисаних мужјака. Такође, нису уочене значајне разлике између стерилисаних и нестерилисаних мужјака унутар истог соја.

Међутим, стерилисани LAB (Rimini) мужјаци су испољили значајно виши почетни морталитет ( $5,00 \pm \text{SEM } 1,10$  уинулих мужјака) у односу на стерилисане WILD мужјаке ( $1,14 \pm 0,55$  уинулих мужјака) ( $p=0,01$ ). Слична ситуација је констатована и приликом посматрања нестерилисаних мужјака, када је LAB (Rimini) сој имао значајно више уинулих мужјака ( $4,14 \pm 1,26$ ), него WILD сој ( $2,25 \pm 0,45$ ) ( $p=0,04$ ) (Табела 6).

Табела 6 Почетни морталитет мужјака из третмана

Table 6 Initial male mortality from treatment enclosures

Сојеви Strains	просечан број уинулих мужјака ° average number of dead males °			
	стерилисани 30 Gy irradiated 30 Gy	SEM	Нестерилисани NON irradiated	SEM
LAB <sup>#</sup> + WILD	3.20	(±0.81)	3.13	(±0.66)
LAB	5.00	(±1.10)	4.14	(±1.26)
WILD	1.14	(±0.55)	2.25	(±0.45)
	стерилисани 30 Gy irradiated 30 Gy	SEM	стерилисани 30 Gy irradiated 30 Gy	SEM
LAB : WILD	5.00**	(±1.10)	1.14**	(±0.55)
	Нестерилисани NON irradiated	SEM	Нестерилисани NON irradiated	SEM
LAB : WILD	4.14*	(±1.26)	2.25*	(±0.45)

- ° Почетни морталитет мужјака, израчунат на основу збира уинулих лутки, уинулих одраслих који нису завршили еклозију и уинулих одраслих на површини воде; *Initial male mortality, calculated based on sum of dead pupae, dead adults which did not successfully completed emergence, and dead adults on the water surface*
- Бројеви у истом реду праћени са \*\* су значајно различити за  $p < 0,01$ ; *Numbers in the same row followed by the \*\* are significantly different for  $p < 0.01$ .*
- Бројеви у истом реду праћени са \* су значајно различити за  $p < 0,05$ ; *Numbers in the same row followed by the \* are significantly different for  $p < 0.05$ .*
- У заградама је приказана  $\pm$  стандардна грешка (SEM); *Parentheses enclose  $\pm$  standard error (SEM)*
- # У третману је коришћен LAB сој Rimini; *LAB strain Rimini was used during treatment*

Важно је истаћи да при израчунавању CIS и Fried индекса нису узете у обзир вредности почетног морталитета мужјака (тј. подразумеван је укупан број интродукованих стерилних и фертилних мужјака односно 100:100), пошто је почетни морталитет мужјака заправо већ индиректно укључен у добијене (израчунате) вредности двају индекса. То је изражено кроз следећи ланац догађаја: број почетно уинулих мужјака директно утиче на стопу парења (односно ако више мужјака једног соја уине, стопа парења са мужјацима тог соја ће опасти), те ће последично бити смањен и број „потомака“ (предметног соја). Дакле, ако уине више стерилних него фертилних мужјака, биће положено више вијабилних јаја, и обрнуто.

Да би се могло извести одговарајуће поређење почетног морталитета мужјака из контроле (2012. год.) и третмана (2013. и 2014. год.), било је неопходно посматрати засебно почетни морталитет фертилних мужјака. Осим тога, с обзиром да су током експеримента коришћена три различита соја врсте *Aedes albopictus* (у контроли – LAB сој RER (генерације F8, F9), а у третману – LAB сој Rimini (F52, F53, F54) и WILD сој Crevalcore (F0)), поређење почетног морталитета фертилних мужјака током експерименталних година омогућило је сакупљање драгоцених података, неопходних за оцену квалитета мужјака

који припадају различитим сојевима и генерацијама. Утврђивање значајности разлике почетног морталитета фертилних мужјака (између различитих испитиваних сојева и година, чији приказ следи) се у свим случајевима базирало на поређењу пропорција почетног морталитета фертилних мужјака (односно укупног броја уинулих фертилних лутки и одраслих мужјака уинулих током или након еклозије) и укупног броја интродукованих фертилних лутки мужјака.

Тест поређења пропорција показао је високо значајну разлику између укупног почетног морталитета фертилних мужјака из контроле (укупно за сва понављања у 2012. год.) и третмана (укупно за оба соја и обе године) ( $p=0,0082$ ) (Табела 7).

Табела 7 Поређење укупног почетног морталитета фертилних мужјака из контроле и третмана

Table 7 Comparison of total initial fertile male mortality between control and treatment, shown through proportion test

	Година Year	Сојеви Strains	Почетни морталитет фертилних мужјака <sup>°</sup> Initial fertile male mortality <sup>°</sup>	Укупан број фертилних лутки мужјака Total N fertile male pupae	Пропорција (%) Proportion (%)
Контрола Control	2012	LAB (RER)	3	400	0.75 a
Третман Treatment	2013+2014	LAB (Rimini) + WILD	47	1500	3.13 b

- <sup>°</sup> Укупан број уинулих фертилних јединки мужјака (лутке и одрасли уинули током или након еклозије) у оквиру посматраног соја/сојева и године/година; *Total number of dead fertile male specimens (pupae and adults which died during or after emergence) within observed strain(s) and year(s).*

Бројеви у истој колони праћени истим словом нису статистички значајно различити за  $p<0,05$ ; *Numbers in the same column followed by the same letter are not significantly different for  $p<0.05$ .*

Осим тога, поређење пропорција укупног почетног морталитета фертилних мужјака током експерименталних година (у годинама третмана су обједињено посматрана оба коришћена соја) показало је следеће:

- између 2012. и 2013. год. није било значајних разлика у пропорцијама
- између 2012. и 2014. год. констатоване су високо значајне разлике ( $p=0,0021$ )
- између 2013. и 2014. год. констатоване су значајне разлике ( $p=0,0188$ ) (Табела 8)

Табела 8 Поређење укупног почетног морталитета фертилних мужјака између експерименталних година

Table 8 Comparison of total initial fertile male mortality between experimental years, shown through proportion test

	година year	Сојеви и генерације Strains and generations	Почетни морталитет фертилних мужјака <sup>°</sup> Initial fertile male mortality <sup>°</sup>	Укупан број фертилних лутки мужјака/години Total N fertile male pupae /year	Пропорција (%) Proportion (%)
Контрола Control	2012	LAB (RER: F8, F9)	3	400	0.75 a
Третман Treatment	2013	LAB (Rimini: F52) + WILD (F0)	5	400	1.25 a
Третман Treatment	2014	LAB (Rimini: F53, F54) + WILD (F0)	42	1100	3.82 b

- <sup>°</sup> Укупан број угинулих фертилних јединки мужјака (лутке и одрасли угинули током или након еклозије) у оквиру посматраног соја/сојева и године; *Total number of dead fertile male specimens (pupae and adults which died during or after emergence) within observed strain(s) and year.*

-Бројеви у истој колони праћени истим словом нису статистички значајно различити за  $p<0,05$ ; *Numbers in the same column followed by the same letter are not significantly different for  $p<0.05$ .*

Да би се одредиле разлике између почетног морталитета фертилних мужјака различитих LAB сојева, коришћених у контроли (RER) и третману (Rimini), такође је изведен тест поређења пропорција. Он је показао значајно нижи морталитет у контроли него у третману (обе године) ( $p=0,013$ ) (Табела 9).

Табела 9 Поређење почетног морталитета фертилних мужјака LAB сојева из контроле и третмана

Table 9 Comparison of initial fertile male mortality of LAB strains only, between control and treatment, shown through proportion test

	година year	LAB сојеви LAB strains	Почетни морталитет фертилних мужјака <sup>°</sup> Initial fertile male mortality <sup>°</sup>	Укупан број фертилних лутки мужјака Total N fertile male pupae	Пропорција (%) Proportion (%)
Контрола Control	2012	RER	3	400	0.75 a
Третман Treatment	2013+2014	Rimini	29	700	4.14 b

- <sup>°</sup> Укупан број угинулих фертилних јединки мужјака (лутке и одрасли угинули током или након еклозије) у оквиру посматраног соја и године/година; *Total number of dead fertile male specimens (pupae and adults which died during or after emergence) within observed strain and year(s).*

- Бројеви у истој колони праћени истим словом нису статистички значајно различити за  $p<0,05$ ; *Numbers in the same column followed by the same letter are not significantly different for  $p<0.05$ .*

Осим тога, поређење пропорција почетног морталитета фертилних мужјака LAB сојева показало је сличну тенденцију као укупни почетни морталитет током експерименталних година:

- између 2012. и 2013. год. није било значајних разлика у пропорцијама
- између 2012. и 2014. год. констатоване су високо значајне разлике ( $p=0.000$ )
- између 2013. и 2014. год. констатоване су значајне разлике ( $p=0.012$ ) (Табела 10)

Табела 10 Поређење почетног морталитета фертилних мужјака LAB сојева између експерименталних година

Table 10 Comparison of initial fertile male mortality of LAB strains only between experimental years, shown through proportion test

	година year	LAB сојеви и генерације LAB strains and generations	Почетни морталитет фертилних мужјака <sup>°</sup> Initial fertile male mortality <sup>°</sup>	Укупан број фертилних лутки мужјака/години Total N fertile male pupae/year	Пропорција (%) Proportion (%)
Контрола Control	2012	RER (F8, F9)	3	400	0.75 a
Третман Treatment	2013	Rimini (F52)	4	300	1.33 a
Третман Treatment	2014	Rimini (F53, F54)	25	400	6.25 b

- <sup>°</sup> Укупан број угинулих фертилних јединки мужјака (лутке и одрасли угинули током или након еклозије) у оквиру посматраног соја и године; *Total number of dead fertile male specimens (pupae and adults which died during or after emergence) within observed strain and year.*

- Бројеви у истој колони праћени истим словом нису статистички значајно различити за  $p<0,05$ ; *Numbers in the same column followed by the same letter are not significantly different for  $p<0.05$ .*

Тест поређења пропорција почетног морталитета није показао значајну разлику између LAB соја (RER) коришћеног у контроли (2012. год.) и WILD соја коришћеног у третману (обе године) (Табела 11).

Табела 11 Поређење почетног морталитета фертилних мужјака LAB соја из контроле и WILD соја из третмана

Table 11 Comparison of initial fertile male mortality between control LAB strain and treatment WILD strain, shown through proportion test

	година year	Сојеви Stains	Почетни морталитет фертилних мужјака <sup>о</sup> Initial fertile male mortality <sup>о</sup>	Укупан број фертилних лутки мужјака Total N fertile male pupae	Пропорција (%) Proportion (%)
Контрола Control	2012	LAB (RER)	3	400	0.75 a
Третман Treatment	2013+2014	WILD	18	800	2.25 a

- <sup>о</sup> Укупан број угинулих фертилних јединки мужјака (лутке и одрасли угинули током или након еклозије) у оквиру посматраног соја и године/година; *Total number of dead fertile male specimens (pupae and adults which died during or after emergence) within observed strain and year(s).*

- Бројеви у истој колони праћени истим словом нису статистички значајно различити за  $p < 0,05$ ; *Numbers in the same column followed by the same letter are not significantly different for  $p < 0.05$ .*



Поред тога, тестиране су и разлике у пропорцијама између LAB соја (RER) коришћеног у контроли и WILD соја коришћеног у третману, током експерименталних година. Резултати су показали следеће:

- као и претходним тестирањима, између 2012. и 2013. год - нису уочене значајне разлике у пропорцијама
- између 2012. и 2014. год. – запажена је значајна разлика ( $p= 0,0449$ ) (у претходним тестирањима је између ове две године разлика била много израженија односно високо значајна)
- интересантно је, пак, да је приликом међусобног поређења година третмана (тј. 2013. и 2014. год.) није уочена значајна разлика у почетном морталитету фертилних мужјака WILD соја (Табела 12).

Табела 12 Поређење почетног морталитета фертилних мужјака између LAB соја из контроле и WILD соја из третмана током експерименталних година

Table 12 Comparison of initial fertile male mortality between control LAB strain and treatment WILD strain between experimental years, shown through proportion test

	година year	Сојеви strains	Почетни морталитет фертилних мужјака <sup>°</sup> Initial fertile male mortality <sup>°</sup>	Укупан број фертилних лутки мужјака/години Total N fertile male pupae/year	Пропорција (%) Proportion (%)
Контрола Control	2012	LAB (RER: F8, F9)	3	400	0.75 a
Третман Treatment	2013	WILD (F0)	1	100	1.00 ab
Третман Treatment	2014	WILD (F0)	17	700	2.43 b

- <sup>°</sup> Укупан број угинулих фертилних јединки мужјака (лутке и одрасли угинули током или након еклозије) у оквиру посматраног соја и године; *Total number of dead fertile male specimens (pupae and adults which died during or after emergence) within observed strain and year.*

- Бројеви у истој колони праћени истим словом нису статистички значајно различити за  $p<0,05$ ; *Numbers in the same column followed by the same letter are not significantly different for  $p<0.05$ .*

Преглед свих изведених тестирања у вези са поређењем почетног морталитета фертилних мужјака из контроле (2012.) и термана (2013.+2014. год.), као и засебно током експерименталних година приказан је у Табелама 13 и 14.

Табела 13 Преглед поређења пропорција између контроле и третмана, у складу са коришћеним сојевима

Table 13 Overview of proportion comparison (of initial fertile male mortality on the number of fertile male pupae introduced) between control and treatment in accordance with strains involved

	година year	Сојеви Strains	Пропорција (%) Proportion (%)	Сојеви Strains	Пропорција (%) Proportion (%)	Сојеви Strains	Пропорција (%) Proportion (%)
Контрола Control	2012	LAB (RER)	0.75 a	LAB (RER)	0.75 a	LAB (RER)	0.75 a
Третман Treatment	2013+2014	LAB (Rimini)+ WILD	3.13 b	LAB (Rimini)	4.14 b	WILD	2.25 a

Бројеви у истој колони праћени истим словом нису статистички значајно различити за  $p < 0,05$ ; *Numbers in the same column followed by the same letter are not significantly different for  $p < 0.05$ .*

Табела 14 Преглед поређења пропорција током експерименталних година у складу са коришћеним сојевима

Table 14 Overview of proportion comparison (initial fertile male mortality on the number of fertile male pupae introduced) during experimental years in accordance with strains involved

	година year	Сојеви и генерације Strains and generations	Пропорција (%) Proportion (%)	Сојеви Strains	Пропорција (%) Proportion (%)	Сојеви Strains	Пропорција (%) Proportion (%)
Контрола Control	2012	LAB (RER: F8, F9)	0.75 a	LAB (RER)	0.75 a	LAB (RER)	0.75 a
Третман Treatment	2013	LAB (Rimini: F52)+ WILD (F0)	1.25 a	LAB (Rimini)	1.33 a	WILD	1.00 ab
Третман Treatment	2014	LAB (Rimini F53, F54)+ WILD (F0)	3.82 b	LAB (Rimini)	6.25 b	WILD	2.43 b

Бројеви у истој колони праћени истим словом нису статистички значајно различити за  $p < 0,05$ ; *Numbers in the same column followed by the same letter are not significantly different for  $p < 0.05$ .*

### 5.2.2. Почетни морталитет женки

Почетни морталитет женки био је веома низак. Током целог експеримента су утврђене само две угинуле женке од 1.900 укупно интродукованих: једна је припадала LAB соју (у контроли током 2012. год.), а друга WILD соју (у третману 2014. год.).

### 5.2.3. Број крвљу нахрањених женки по тунелу; број јаја по тунелу; фекондитет; фертилитет; CIS и Fried индекси

- Број крвљу нахрањених женки по тунелу (стопа исхране крвљу) није испољио статистички значајне разлике између контроле и третмана, нити искључиво у третману између различитих комбинација сојева. Међутим, стопа исхране крвљу је показала изузетно високе варијације између понављања током целог експеримента, те се у контроли кретала у распону од 7 до 62%, док је у третману тај опсег био ужи: од 5 до 42% (Табела 15).

Табела 15 Број крвљу нахрањених женки *Ae. albopictus* по тунелу и варирања између понављања у оквиру исте комбинације сојева

Table 15 Number of blood-fed *Ae. albopictus* females per enclosure and its range among replicates within same strain combination

Комбинације сојева Strain combination	Бр. N	Бр. крвљу нахрањених женки/тунелу (%) N blood-fed females/enclosure (%)	Распон (%) Range (%)
<b>Контрола/Control</b> <b>(0 : ♂LAB_ ♀LAB)</b>	4	32.25 a	7-62
SEM		(±11.33)	
♂LAB 30 Gy : ♂WILD_ ♀WILD	4	21.75 a	15-29
SEM		(±2.93)	
♂LAB 30 Gy : ♂WILD_ ♀LAB	4	20.50 a	12-25
SEM		(±3.07)	
♂WILD 30 Gy : ♂LAB_ ♀WILD	4	24.25 a	5-40
SEM		(±7.40)	
♂WILD 30 Gy : ♂LAB_ ♀LAB	3	24.00 a	9-42
SEM		(±9.64)	

Комбинације сојева (стерилни мужјаци : фертилни мужјаци \_ неспарене женке); *Strain combination (sterile males : fertile males\_virgin females)*

0 – Нису интродуковани стерилисани мужајаци (контрола); *None sterile males (control)*

Бр. (N) – Број изведених понављања за одређену комбинацију сојева; *Number of replicates performed for specific strain combination*

У заградама је приказана  $\pm$  стандардна грешка (SEM); *Parentheses enclose  $\pm$  standard error (SEM).*

Бројеви у истој колони праћени истим словом нису статистички значајно различити за  $p < 0,05$ ; *Numbers in the same column followed by the same letter are not significantly different for  $p < 0.05$*

**- Укупан број положених јаја по тунелу је испољио колебења између понављања у оквиру исте врсте третмана, као и унутар контроле, али није показао статистички значајне разлике нити у случају међусобног поређења различитих комбинација третмана и контроле (Табела 16, Графикон 7), нити искључиво између тунела са различитим комбинацијама третмана.**

Табела 16 Параметри за одређивање конкуритивности стерилисаних и фертилних мужјака *Ae. albopictus* у експерименталним тунелима

Table 16 Parameters for *Ae. albopictus* sterile and fertile male mating competitiveness assessment in large experimental enclosures

Комбинације сојева Strain combination	Бр. N	Бр. јаја/тунелу N eggs/enclosure	Бр. јаја/крвљу нахрањеној женки N eggs/blood- fed female	% пиљења јаја % egg hatching	CIS Index	Fried Index
<b>Контрола/Control (0 : ♂LAB_ ♀LAB)</b>	4	1216.25 a	39.07 a	89.05 a	-	-
SEM		(±471.89)	(±4.06)	(±2.33)		
♂LAB 30 Gy : ♂WILD_ ♀WILD	4	888 a	45.04 a	51.07 ac	0.80 a	0.85 a
SEM		(±204.67)	(±13.03)	(±5.28)	(±0.19)	(±0.21)
♂LAB 30 Gy : ♂WILD_ ♀LAB	4	1152.25 a	54.43 a	39.16 bc	1.41 a	1.54 a
SEM		(±288.15)	(±11.39)	(±5.45)	(±0.34)	(±0.38)
♂WILD 30 Gy : ♂LAB_ ♀WILD	4	1600.50 a	70.61 a	52.19 ac	0.73 a	0.78 a
SEM		(±433.97)	(±5.11)	(±3.97)	(±0.12)	(±0.13)
♂WILD 30 Gy : ♂LAB_ ♀LAB	3	1480.67 a	62.78 a	33.26 bc	1.79 a	1.97 a
SEM		(±573.13)	(±1.53)	(±5.08)	(±0.37)	(±0.43)

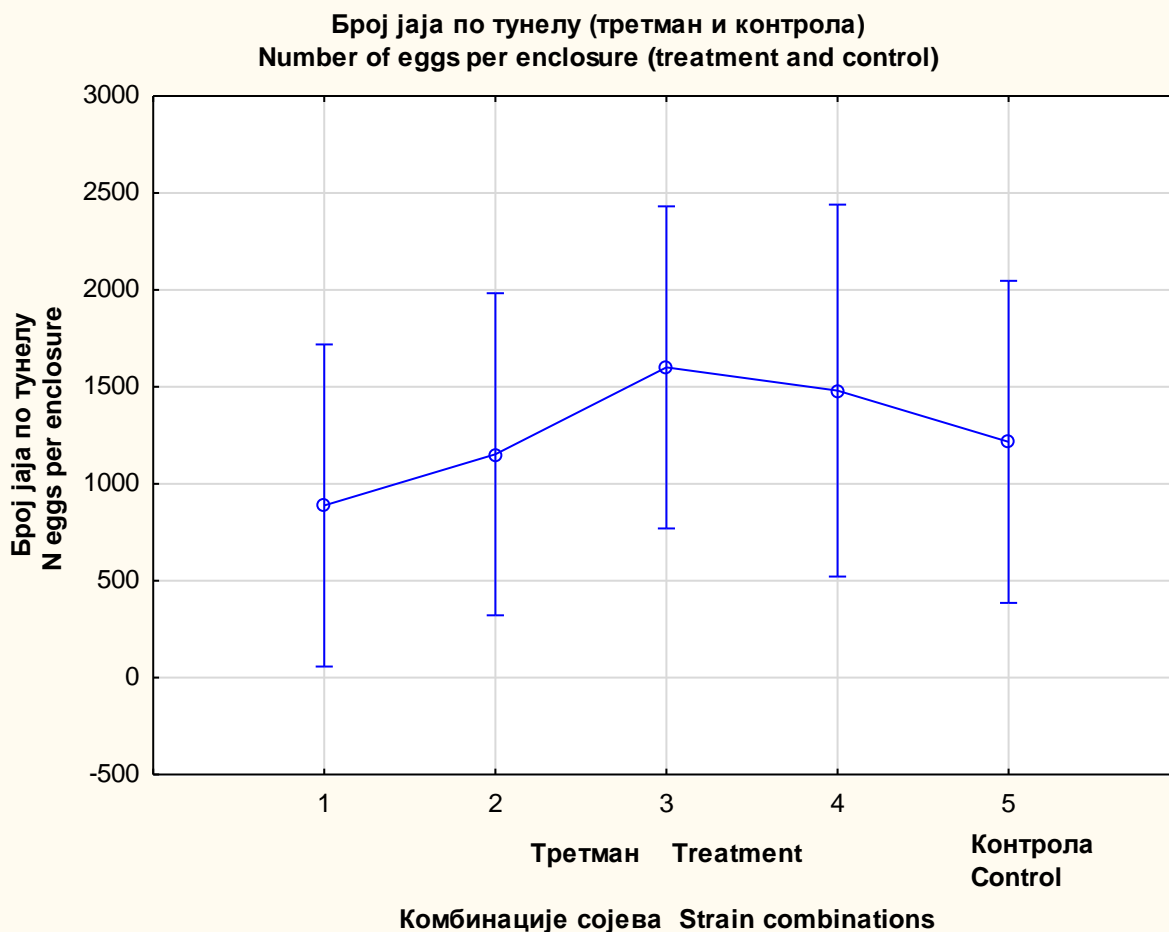
Комбинације сојева (стерилни мужјаци : фертилни мужјаци \_ неспарене женке); *Strain combination (sterile males : fertile males\_virgin females)*

0 – Нису интродуковани стерилисани мужајаци (контрола); *None sterile males (control)*

Бр.– Број изведених понављања за одређену комбинацију сојева; *N - Number of replicates performed for specific strain combination*

У заградама је приказана ± стандардна грешка (SEM); *Parentheses enclose ± standard error (SEM).*

Бројеви у истој колони праћени истим словом нису статистички значајно различити за  $p < 0,05$ ; *Numbers in the same column followed by the same letter are not significantly different for  $p < 0.05$ .*



Графикон 7 Број јаја по тунелу (различите комбинације сојева у третману (1,2,3,4) и контроли (5))

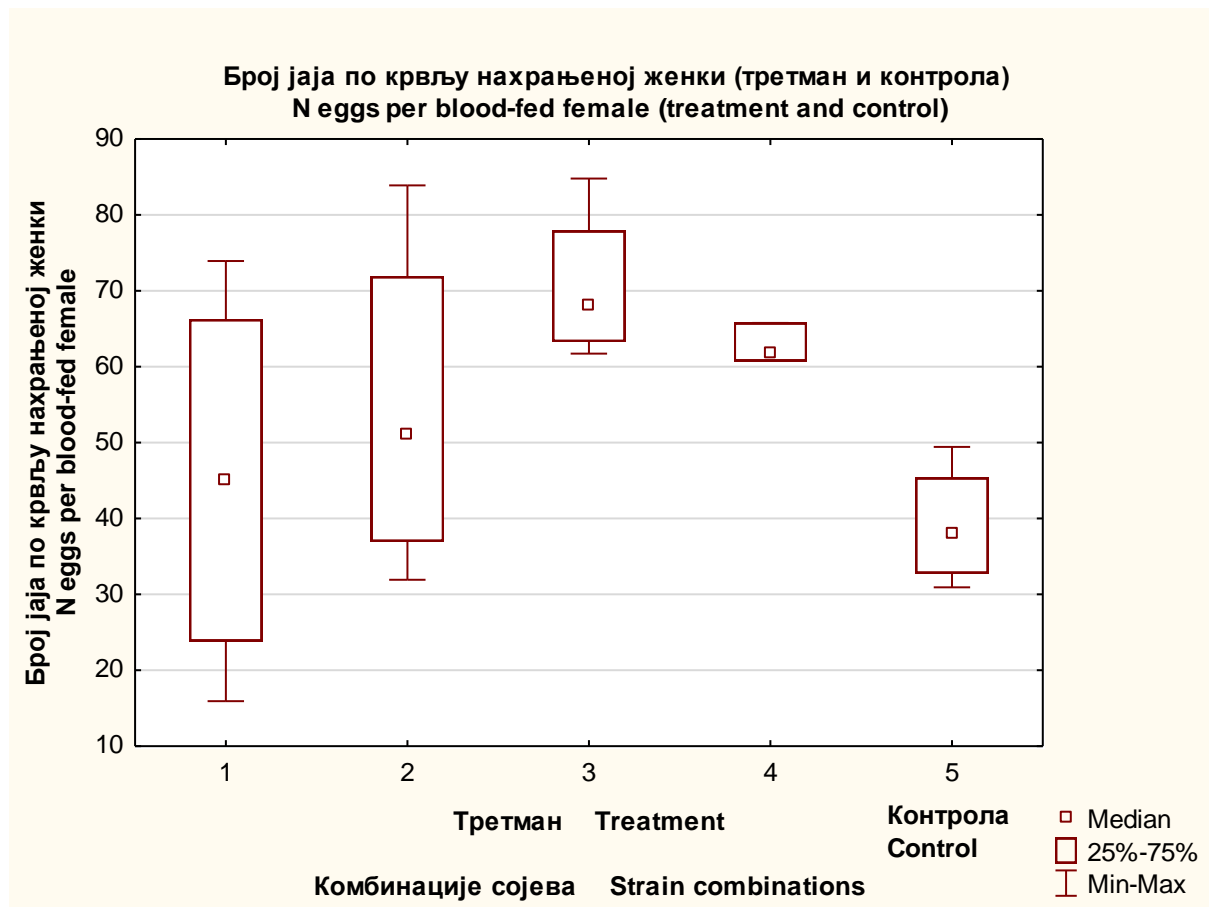
Figure 7 Number of eggs per enclosure (different treatment strain combinations (1,2,3,4) and control (5))

Комбинације сојева; *Strain combinations*

- 1 ♂LAB 30 Gy : ♂WILD \_ ♀WILD
- 2 ♂LAB 30 Gy : ♂WILD \_ ♀LAB
- 3 ♂WILD 30 Gy : ♂LAB \_ ♀WILD
- 4 ♂WILD 30 Gy : ♂LAB \_ ♀LAB
- 5 CONTROL : ♂LAB \_ ♀LAB

- **Фекондитет женки (број јаја по крвљу нахрањеној женки)**. С обзиром да само део женки узима крвни оброк, сматрано је прикладнијим рачунање фекондитета на основу броја женки које су узеле крвни оброк у сваком тунелу. Број јаја положен по крвљу

нахрањеној женки показао је флукуације између понављања у оквиру исте комбинације третмана, као и унутар контроле, али није забележена статистички значајна разлика ни између контроле и различитих комбинација третмана (Табела 16, Графикон 8), нити између тунела са различитим комбинацијама третмана.



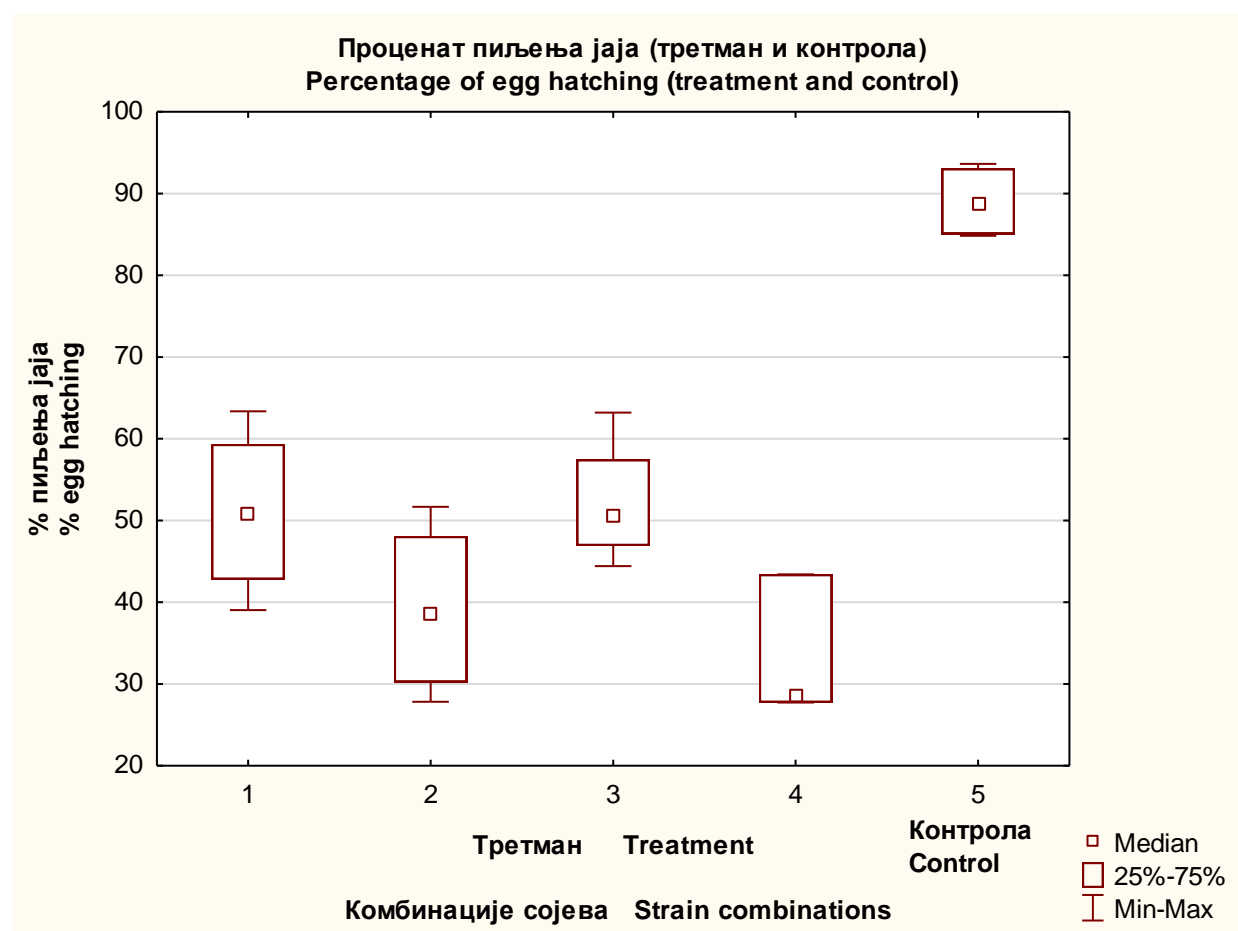
Графикон 8 Број јаја по крвљу нахрањеној женки (различите комбинације сојева у третману (1,2,3,4) и контроли (5))

Figure 8 The number of eggs per blood-fed female (different treatment strain combinations in treatment (1,2,3,4) and control (5))

Комбинације сојева; *Strain combinations*

- 1 ♂LAB 30 Gy : ♂WILD \_ ♀WILD
- 2 ♂LAB 30 Gy : ♂WILD \_ ♀LAB
- 3 ♂WILD 30 Gy : ♂LAB \_ ♀WILD
- 4 ♂WILD 30 Gy : ♂LAB \_ ♀LAB
- 5 CONTROL : ♂LAB \_ ♀LAB

- Стопа фертилитета јаја (процент пиљења јаја) у контроли ( $89,05\% \pm \text{SEM } 2,33$ ) била је значајно различита у односу на другу комбинацију третмана ( $39,16\% \pm 5,45$ ) ( $p=0,046$ ) и високо значајно различита у односу на четврту комбинацију третмана ( $33,26\% \pm 5,08$ ) ( $p=0,009$ ), док прва и трећа комбинација третмана нису испољиле значајне разлике у поређењу са контролом (Табела 16, Графикон 9). Осим тога, између различитих комбинација третмана нису забележене значајне разлике у проценту пиљења јаја. Анализирани резултати засновани су на подацима прикупљеним на основу укупно 23.870,00 мануелно пребројаних, прегледаних и процесуираних јаја.



Графикон 9 Стопа фертилитета јаја (процент пиљења јаја) (различите комбинације сојева у третману (1,2,3,4) и контроли (5))

Figure 9 The egg fertility rate (percentage of egg hatching) (different treatment strain combinations (1,2,3,4) and control (5))



Комбинације сојева; *Strain combinations*

♂LAB 30 Gy : ♂WILD \_ ♀WILD

♂LAB 30 Gy : ♂WILD \_ ♀LAB

♂WILD 30 Gy : ♂LAB \_ ♀WILD

♂WILD 30 Gy : ♂LAB \_ ♀LAB

CONTROL : ♂LAB \_ ♀LAB

- Капацитет за индуковање стерилитета у популацију (CIS индекс) и конкуритивност мужјака (Fried индекс) нису показали значајне разлике између различитих комбинација третмана, иако су оба индекса имала више вредности у другој (CIS:  $1,41 \pm \text{SEM } 0,34$ ; Fried:  $1,54 \pm 0,38$ ) и четвртој комбинацији третмана (CIS:  $1,79 \pm 0,37$ ; Fried:  $1,97 \pm 0,43$ ), у односу на преостале две комбинације (у којима су обе индексне вредности биле испод 1) (Табела 16).

#### 5.2.4. Утицај метеоролошких фактора

##### а) Корелације метеоролошких фактора и просечне дневне стопе преживљавања

Испитиване су корелације различитих метеоролошких фактора (средња дневна температура, просечна максимална и минимална дневна температура, апсолутна максимална и минимална температура за сваки период, средња дневна RH) и просечних дневних стопа преживљавања мужјака и женки (SR). Корелације су израчунате засебно за оба пола и у складу са коришћеним сојем (код свих женки, и мужјака у контроли) или комбинацијом сојева (код мужјака у третману) (Табела 18). Током експеримента није увек било могуће прибавити податке неопходне за израчунавање дневне стопе преживљавања (услед извесних специфичности које ће бити размотрене на следећој страни). Да би се могао обезбедити довољно дуг низ SR података неопходних за утврђивање жељених корелација, одлучено је да се SR вредности оба лабораторијска соја третирају заједно (LAB сој). Вредности метеоролошких фактора и просечних дневних стопа преживљавања мужјака и женки током различитих експерименталних периода приказане су у Табели 17.

Просечне дневне стопе преживљавања мужјака су израчунате засебно за тунеле са „истим типом мужјака“ (односно истим сојем/комбинацијом сојева мужјака у тунелу) (Табела 17).

Стога се дневне стопе преживљавања приказане у колони LAB сој (Табела 17), односе на ситуације када су у тунеле интродуковани фертилни мужјаци LAB соја и то:

- а) током контроле (2012. год.) када су коришћене искључиво фертилне јединке LAB соја и
- б) током третмана (2013. и 2014. год.) у случајевима када је коришћена следећа комбинација сојева мужјака: ♂WILD 30 Gy : ♂LAB.

Дневне стопе преживљавања мужјака приказане у колони WILD сој (Табела 17), односе се на другу комбинацију сојева мужјака током година третмана, када су коришћени фертилни мужјаци WILD соја: ♂LAB 30 Gy : ♂WILD.

Дневне стопе преживљавања женки су такође утврђене независно за LAB и WILD сојева (Табела 17), у складу са сојем коме су припадале женке интродуковане у одређени тунел.

Осим тога, постојале су и две ситуације када није било могуће прибавити податке неопходне за израчунавање дневне стопе преживљавања:

- а) Када су у једном периоду били коришћени искључиво женке/мужјаци истог соја или мужјаци исте комбинације сојева, те није било могуће обезбедити податке о дневној стопи преживљавања за супротан сој/комбинацију сојева у посматраном периоду (што је приказано у Табели 17 симболом средње црте '-'). То се догодило у контроли током 2012. год., и још у неколико наврата током година третмана.
- б) Када у одређеном тунелу по периоду на крају експеримента није сакупљен (аспириран) ни један мужјак и/или женка (тј. када нису преживели до последњег дана експеримента), те није било могуће исправно одредити дневне стопе преживљавања (што је приказано у Табели 17 као 'no SR data').

Табела 17 Вредности метеоролошких фактора и просечних стопа дневног преживљавања (SR) мужјака и женки током 11 периода.

Table 17 Values of meteorological factors, male and female mean daily survival rates (SR) during 11 periods

година year	период period	пол sex	средња дневна t average t/day (°C)	просечна MAX дневна t average MAX t/day (°C)	просечна min дневна t average min t/day (°C)	апсолутна MAX t/периоду absolute MAX t/period (°C)	апсолутна min t/периоду absolute min t/period (°C)	средња дневна RH average RH/day (%)	просечна стопа дневног преживља- вања (SR) LAB соја <sup>^</sup> mean daily survival rate (SR) LAB strain <sup>^</sup>	просечна стопа дневног преживља- вања (SR) WILD соја <sup>^^</sup> mean daily survival rate (SR) WILD strain <sup>^^</sup>
2012	1	♂	25.96	32.23	19.44	36.7	16.9	41.38	0.66	-
		♀	25.68	31.99	19.11	36.7	16.9	41.36	no SR data	-
	2	♂	28.67	35.79	21.55	39.1	19	42.85	0.66	-
		♀	28.98	36.08	21.87	39.1	20.7	41.64	no SR data	-
	3	♂	24.71	30.87	18.61	38.5	14.3	56.07	no SR data	-
		♀	23.86	29.85	17.91	38.5	14.3	57.92	0.60	-
	4	♂	21.24	26.95	16.11	30.7	13	62.85	0.84	-
		♀	21.12	26.89	15.84	30.7	13	60.73	0.88	-
2013	5	♂	28.15	34.99	21.45	39.7	18.5	42.46	0.67	-
		♀	28.45	35.38	21.92	39.7	19	42.45	-	0.61
	6	♂	23.33	29.12	17.41	33.8	15.9	56.54	no SR data	-
		♀	23.59	29.65	17.57	33.8	15.9	55.18	-	0.74
	7	♂	23.43	29.98	17.02	32.4	15	54.85	-	0.62
		♀	23.71	30.34	17.15	32.4	15	53.64	0.74	-
2014	8	♂	24.27	29.81	18.54	34.5	16	65.29	-	0.64
		♀	23.93	29.28	18.47	34.5	16	67.25	-	0.71
	9	♂	24.93	30.49	19.51	33.3	16.8	63.79	0.82	no SR data
		♀	25.57	31.29	19.82	33.3	17.9	61.08	0.68	0.73
	10	♂	21.69	27.29	16.59	32	13	67.29	0.70	0,79
		♀	21.25	26.76	16.18	29	13	67.83	0.80	0.77
	11	♂	21.69	26.82	16.76	31.1	14	71.00	-	0,75
		♀	21.48	26.54	16.50	31.1	14	70.75	0.63	0.76

симбол средње прте '-' – Није било могуће обезбедити SR податак. Односи се на случајеве када је по периоду коришћен само један сој (све женке и мужјаци у контроли)/једна комбинација сојева (мужјаци у третману), те није било могуће прибавити податке о SR за

супротан сој/комбинацију сојева у посматраном периоду; *Hyphen symbol '-'* - *It was not possible to provide SR data. Refers to the cases when only one strain (all females and males in control) /strain combination (males in treatment) per period were involved, hence not possible to provide SR data for the opposite strain/strain combination for observed period*

*'no SR data'* – Није могуће исправно одредити SR пошто није било аспирираних мужјака и/или женки на крају експеримента (тј. нису преживели до последњег дана експеримента); *It was not possible to correctly estimate SR, since there were no aspirated males and/or females at the end of experiment (ie. they didn't survive until last experimental day)*

^ - LAB сој за женке и за мужјаке у контроли, као и комбинација сојева мужјака ♂WILD 30 Gy : ♂LAB;

*LAB strain for females and for males in control, as well as male strain combination ♂WILD 30 Gy : ♂LAB*

^^- WILD сој за женке, као и комбинација сојева мужјака ♂LAB 30 Gy : ♂WILD;

*WILD strain for females; as well as male strain combination ♂LAB 30 Gy : ♂WILD.*

Табела 18 Корелације метеоролошких фактора и а) просечне стопе дневног преживљавања, као и б) почетног морталитета фертилних мужјака

Table 18 Correlations between meteorological factors and: a) mean daily survival rate (SR) as well as b) initial fertile male mortality

Метеоролошки фактори Meteorological factors	Пол Sex	Просечна дневна стопа преживљавања Main daily survival rate				Почетни морталитет фертилних мужјака Initial fertile male mortality									
		SR LAB coj <sup>^</sup>		SR WILD coj <sup>^^</sup>		2012		2013		2013		Све године (11 периода) All years (11 periods)		Само периоди са значајно различитим t° Only periods with significant differences in temperature	
		г	р	г	р	г	р	г	р	г	р	г	р	г	р
средња дневна t average t/day	♂	-0.646		-0.901		0.023		-0.027		-0.734		-0.486		-0.473	
	♀	-0.517		-0.914	*										
просечна MAX дневна t average MAX t/day	♂	-0.670		-0.947		0.038		-0.097		-0.756		-0.504		-0.554	*
	♀	-0.411		-0.915	*										
просечна min дневна t average min t/day	♂	-0.584		-0.619		-0.023		-0.063		-0.199		-0.300		-0.387	
	♀	-0.561		-0.914	*										
апсолутна MAX t/периоду absolute MAX t/period	♂	-0.779		-0.610											
	♀	-0.691		-0.959	*										
апсолутна min t/периоду absolute min t/period	♂	-0.547		-0.889											
	♀	-0.440		-0.824	*										
средња дневна RH average RH/day	♂	0.735		0.775											
	♀	-0.053		0.819	*										

r – Pearson-ов коефицијент корелације; *The Pearson correlation coefficient*

\* - статистичка значајност за  $p < 0,05$ ; *statistically significant for  $p < 0.05$*

<sup>^</sup> - LAB сој за женке и за мужјаке у контроли, комбинација сојева мужјака ♂WILD 30 Gy : ♂LAB;

*LAB strain for females and for males in control, male strain combination ♂WILD 30 Gy : ♂LAB*

<sup>^^</sup> - WILD сој за женке, комбинација сојева мужјака ♂LAB 30 Gy : ♂WILD;

*WILD strain for females; male strain combination ♂LAB 30 Gy : ♂WILD*

Значајне корелације ( $p < 0,05$ ) између посматраних метеоролошких фактора и дневних стопа преживљавања примећене су само код женки WILD соја (Табела 18), када је значајност била евидентирана у свим испитаваним корелацијама. Корелације дневних стопа преживљавања женки WILD соја са средњом, максималном и минималном дневном температуром и апсолутном максималном температуром по периоду тестирања биле су све врло високе и негативне ( $r = -0,914$ ,  $r = -0,915$ ,  $r = -0,914$ , и  $r = -0,959$  респективно). Корелација дневне стопе преживљавања женки WILD соја и апсолутне минималне температуре по периоду тестирања била је висока и негативна ( $r = -0,824$ ), док је у случају средње дневне RH била висока и позитивна ( $r = 0,819$ ) (Табела 18).

Интересантно је да дневна стопа преживљавања женки LAB соја није показала никакву значајну корелацију са посматраним метеоролошким факторима. Исто важи и за дневну стопу преживљавања мужјака (и то у обе комбинације сојева мужјака: ♂WILD 30 Gy : ♂LAB, и ♂LAB 30 Gy : ♂WILD) која није била у значајној корелацији ни са једним од посматраних метеоролошких фактора (Табела 18).

#### **б) Корелације метеоролошких фактора (температурних параметара за првих 6 дана) и укупног почетног морталитета фертилних мужјака (сва три соја)**

Као што је већ описано у поглављу Материјал и метод рада (Оглед II), почетни морталитет мужјака је регистрован 6 дана након интродукције лутки мужјака у тунеле, приликом чега је пажљиво прегледан садржај сваке црне кантице (које су служиле за интродукцију одговарајућих лутки мужјака), те су евидентирани све угинуле лутке, угинули одрасли који нису успешно завршили еклозију, и угинули одрасли који су завршили еклозију (али нису могли да одлете, те су угинули на површини воде).

Иако, током овог експеримента, није мерена температура воде, генерално постоји добра корелација између температуре ваздуха и температуре воде. Стога су праћена три температурна параметра (средња, максимална и минимална дневна температура) током првих 6 дана (тј. од интродукције лутки мужјака до читавања почетног морталитета), а све у циљу утврђивања могуће корелације тих температурних параметара са почетним морталитетом фертилних мужјака. За утврђивање поменутих корелација су у обзир узети искључиво фертилни мужјаци, како би у израчунавање могла бити укључена и 2012. год (тј. година извођења контроле експеримента када су коришћени само фертилни мужјаци

(и то LAB соја RER)). Када су у питању године третмана (2013. и 2014. год.) посматран је збирни почетни морталитет фертилних мужјака оба коришћена соја (LAB соја Rimini и WILD соја).

Наведене корелације су тестиране засебно за сваку експерименталну годину, као и за све године заједно (тј. 11 експерименталних периода). Ни једна од испитиваних корелација између посматраних температура (средња дневна температура, просечна максимална и минимална дневна температура) током првих 6 дана и почетног морталитета фертилних мужјака нија била статистички значајна (Табела 18).

То је довело до идеје да се провери да ли постоје корелације које се односе само на периоде са значајним разликама у температурама и почетном морталитету фертилних мужјака током тих периода. Приликом таквог тестирања, значајна корелација је пронађена само у случају просечне максималне дневне температуре (просечна MAX дневна  $t$ ) током 6 дана и била је умерена и негативна ( $r=-0,554$ ,  $p<0,05$ ) (Табела 18).

Констатовани резултат (виша просечна MAX дневна  $t$  >> нижи почетни морталитет фертилних мужјака) био је прилично изненађујући, што је подстакло даље истраживање ове чињенице.

Стога су изабрани сви периоди са значајним разликама у оквиру посматраних температурних параметара (средња дневна  $t$ , просечна MAX и min дневна  $t$  током првих 6 дана), а потом су сваком од њих придружене одговарајуће вредности почетног морталитета фертилних мужјака (које су регистроване у тим периодима). Сходно томе, свака добијена листа се састојала из парова података у којима су периоди са две значајно различите температуре били праћени одговарајућим вредностима почетног морталитета фертилних мужјака. Занимљиво је да су у свим паровима разлике у температурама биле високо значајне ( $p<0,01$ ).

За сваки од посматраних температурних параметара утврђен је укупан број парова овог типа, као и њихова расподела у оквиру три различите врсте констатованих манифестација (Табела 19):

1. када је у посматраном пару регистровано више угинулих фертилних мужјака на нижој, него на вишој температури (тј. морталитет и температура су били обрнуто пропорционални);

2. када је у посматраном пару регистровано више угинулих фертилних мужјака на вишој, него на нижој температури (тј. морталитет и температура су били пропорционални);

3. када је у посматраном пару број угинулих фертилних мужјака био идентичан на обе температуре (иако су ове температуре биле високо значајно различите). Дакле, чини се да температура није утицала на морталитет мужјака (тј. морталитет и температура нису били у корелацији) (Табела 19).

Табела 19 Преглед укупног броја парова са високо значајно различитим температурама ( $p < 0,01$ ) између периода (током првих 6 дана) и њихова расподела у оквиру три врсте констатованих манифестација

Table 19 Overview of total number of couples with highly significant differences in temperatures ( $p < 0.01$ ) between periods (for first 6 days) and their distribution among three kinds of manifestations registered

Температурни параметри (током првих 6 дана) Temperature parameters (for first 6 days)	Број парова са значајно различитим температурама ( $p < 0,01$ ) између периода	Број парова у оквиру три манифестација односа*		
	The number of couples with significant differences in temperatures ( $p < 0.01$ ) between periods	Number of couples within three ratio manifestations*		
	укупно total	обрнуто пропорционалан reversely proportional	пропорционалан proportional	није у корелацији not correlated
средња дневна t average t/day	7	5	1	1
просечна MAX дневна t average MAX t/day	16	12	2	2
просечна min дневна t average min t/day	7	5	1	1

\* Број парова регистрованих у свакој од три различите манифестације односа почетног морталитета фертилних мужјака и температуре; *Number of couples recorded within each of three different manifestations of initial fertile male mortality and temperature ratio*



Значајне разлике у просечној МАХ дневној  $t$  (током првих 6 дана) између периода, биле су уочене чак у 16 наврата. У оквиру тих парова регистрована је следеће ситуација:

- 12 пута је почетни морталитет фертилних мужјака био обрнуто пропорционалан просечној МАХ дневној  $t$
- 2 пута је био пропорционалан
- 2 пута није било разлике у почетном морталитету фертилних мужјака (иако је посматрани пар испољио високо значајно различите просечне МАХ дневне температуре) (Табела 19).

Када су у питању средња дневна  $t$  и просечна  $\min$  дневна  $t$  (током првих 6 дана), значајне разлике између периода су регистоване код 7 парова унутар сваког од ова два температурна параметра (Табела 19). Број случајева у оквиру сваке од три могуће манифестације односа почетног морталитета фертилних мужјака и температуре био је једнак код оба поменута температурна параметра, и распоређен на следећи начин:

- 5 пута је почетни морталитет фертилних мужјака био обрнуто пропорционалан средњој дневној  $t$  и просечној  $\min$  дневној  $t$
- једном је био пропорционалан
- једном није било разлике у почетном морталитету фертилних мужјака (иако је посматрани пар испољио високо значајно разлике унутар посматране средње дневне  $t$  унутар просечне  $\min$  дневне  $t$ ) (Табела 19).

Резултат је показао да је у већем броју случајева почетни морталитет фертилних мужјака био обрнуто пропорционалан средњој дневној  $t$ , просечној МАХ и  $\min$  дневној  $t$  (током првих 6 дана), у поређењу са бројем случајева када је био пропорционалан или пак није био у корелацији.

### 5.2.5. Бројност резидуалних женки у узорку

Све лутке женки које су прошле кроз сито те се нашле у узорку са „просејаним“ луткама мужјака („просејане“ односно резидуалне женке) биле су елиминисане из узорка током провере под стереомикроскопом. Ипак, подаци о њиховој бројности могли би бити важни у случају рутинске примене SIT-а (као веома значајна информација пре отпуштања мужјака). Примена SIT-а у природи обично подразумева експерименте великих размера у којима се отпуштају стотине хиљада или чак милиони стерилисаних мужјака комараца, тако да „просејане“ лутке обично садрже и изванредно проценат женки, пошто би их мануелно било непрактично издвајати. Прелиминарна информација о могућем проценту резидуалних женки у узорку је важна, не само за планирање SIT-а и предвиђање његове ефикасности, него и као користан податак о квалитету коришћеног соја комараца (као што је већ објашњено и презентовано у поглављу Преглед литературе). Осим тога, ако се SIT примењује у подручјима ендемским за одређене патогене, број отпуштених женки треба да буде минималан (пожељно је да их уопште нема), тако да је информација о вероватноћи њиховог отпуштања од изузетне важности.

У циљу обезбеђивања додатних информација о особинама сојева коришћених у овом експерименту, те утврђивања најприкладнијег соја за SIT апликацију (од укупно три испитивана) израчуната је вероватноћа појаве женки у „просејаном“ узорку за сваки од сојева.

Прво су посматрани сојеви коришћени у третману. Присуство резидуалних женки у просејаном узорку било је различито код LAB соја (Rimini) ( $4,43 \pm \text{SEM } 1,60\%$ ) у односу на WILD сој (Crevalcore) ( $2,13 \pm 1,11\%$ ). Логистичка регресија је показала да је вероватноћа појаве женки у узорку код LAB (Rimini) соја:  $\pi = 0,04458$ , а код WILD соја:  $\pi = 0,02943$  (Табела 20). Шанса за појаву женки у узорку била је за 35% нижа код WILD соја, у односу на LAB (Rimini) сој.

Табела 20 Процент резидуалних женки у узорку и вероватноћа њихове појаве у складу са коришћеним сојем

Table 20 Percentage of residual females in the sample and probability of their occurrence in accordance with strains involved

	сој и генерације strain and generations		
	LAB (Rimini F52, F53, F54)	WILD (Crevalcore F0)	LAB (RER F8, F9)
<b>процент резидуалних женки у узорку (%) percentage of residual females in the sample(%)</b>	4.43	2.13	1.44
<b>SEM</b>	(±1.60)	(±1.11)	(±0.41)
<b>вероватноћа појаве женки у узорку probability of female occurrence in the sample</b>	$\pi = 0.04458$	$\pi = 0.02943$	$\pi = 0.017662$

- У заградама је приказана ± стандардна грешка (SEM); *Parentheses enclose ± standard error (SEM)*

Потом су засебно посматрани и ислучиво LAB сојеви. Поређење присуства резидуалних женки у узорку LAB соја (Rimini) (4,43 ± SEM 1,60%) коришћеног у треману и LAB соја (RER) (1,44 ± 0,41%) коришћеног у контроли, показало је да је вероватноћа појаве женки у узорку Rimini соја:  $\pi = 0,04458$ , док за RER сој износи:  $\pi = 0,017662$  (Табела 20). Шанса за појаву женки у узорку била је 2,595 виша код Rimini соја у односу на сој RER.

Према овим резултатима LAB сој (RER) коришћен у контроли показао је најмању шансу за појаву женки у „просејаном“ узорку.

## 6. ДИСКУСИЈА

### 6.1. Оглед I Испитивање услова масовног узгоја

Ова студија је демонстрирала утицај величине кавеза на дужину крила, преживљавање адулта и продукцију јаја *Aedes albopictus*, током 20 генерација колонизације.

Сви испитивани параметри у свим кавезима испољили су феномен изражених разлика између два потпериода. У првом потпериоду уочена је манифестација значајног опадајућег тренда дужине крила комараца, као и много нижа стопа преживљавања и продукције јаја, услед негативног утицаја новог окружења (колониционог притиска). У другом потпериоду је дошло до обрта ситуације односно појаве растућег тренда свих параметара – што указује на почетак опоравка. Он се прво испољио код преживљавања адулта (после генерације F9), затим код дужине крила (после генерације F11), да би потом дошло до опоравка продукције јаја и много вишег „приноса“ јаја након генерације F15.

Без обзира што је позитиван тренд дужине крила забележен у другом потпериоду, просечне вредности (девет генерација: од F12- F20) су и даље биле ниже у односу на први потпериод, мада су се дужине крила последње генерације приближиле вредностима иницијалне популације. Пошто смо, нажалост, завршили истраживање са генерацијом F20, нисмо били у могућности да видимо да ли би био постигнут потпун опоравак дужине крила (до вредности које је имала иницијална популација). Са друге стране, преживљавање адулта и продукција јаја били су виши у другом потпериоду, него у првом.

Комарци гајени у најмањем кавезу (C1) имали су најдужа крила (код оба пола), и у случају поређења просечних вредности у целом периоду од 20 генерација, и у сваком од потпериода. Дакле, негативан утицај колониционог притиска и димензија кавеза најмање се одразио на комарце из C1. Крила комараца оба пола из кавеза средње величине

(C2) била су значајно краћа него из највећег (C3), посматрајући укупни период и први потпериод. У другом потпериоду ситуација се променила и разлика са C3 није више била значајна, указујући на то да су се комарци из C2 вероватно опорављали брже него комарци из C3, што се такође манифестовало и у случају преживљавања и продукције јаја. Иако су комарци гајени у C1 живели дуже од комараца из C2, нису констатоване значајне разлике између C1 и C2 (ни у једном испитиваном случају); док су комарци из C3 живели значајно краће у поређењу са онима из C1 (адулти, мужјаци и женке), и C2 (женке).

Мада продукција јаја није показала значајне разлике међу кавезима у целом периоду и првом потпериоду, у другом потпериоду кавез C3 је испољио значајно ниже вредности од кавеза C1 и C2. Заправо, у том периоду је у C1 и C2 дошло до изузетно високог пораста продукције јаја, што указује на добру адаптацију на нове услове и у складу је са налазима презентованим у Hoffmann and Ross (2018), док је C3 остао на истом нивоу као и у првом потпериоду. Упркос чињеници да C1 и C2 ниси били значајно различити, C1 је у другом потпериоду испољио много умереније осцилације у продукцији јаја од C2. Према Ponlawat and Harrington (2007) старији мужјаци *Aedes aegypti* (старости од 10 до 20 дана) чешће имају више сперме у својим репродуктивним органима него млађи мужјаци (старости до 10 дана). У нашем експерименту мужјаци из мањих кавеза (C1 и C2) живели су дуже од мужјака из највећег кавеза, чиме би се могла објаснити много већа продукција јаја у мањим кавезима.

Величина крила адулта је централна карактеристика која се проучава у студијама о виталности комараца (Koenraad 2008), док се могућим факторима који су одговорни за успешност парења мужјака сматрају: величина крила мужјака (Yuval et al. 1993, Voordouw and Koella 2007, Huho et al. 2007, Maïga et al. 2012), старост (Verhoek and Takken 1994, Chambers and Klowden 2001, Huho et al. 2006, 2007), генетика (Voordouw and Koella 2007), дужина сперматозоида (Klowden and Chambers 2004, Voordouw and Koella 2008) и енергетске резерве (Yuval et al. 1994, Huho et al. 2007, Maïga et al. 2012).

Изненађујуће, у нашем експерименту није пронађено много значајних корелација између дужине крила и друга два испитивана параметра (преживљавања адулта и продукције јаја), можда због високе варијабилности и релативно малог узорка. Осим тога, иако су комарци гајени у C3 имали значајно дужа крила од комараца из C2 (код оба пола),

преживљавање адулта и продукција јаја су у С3 испољили ниже вредности него у С2. На основу поменутог, чини се да дужина крила не одражава увек вредности продукције јаја и преживљавања адулта (односно дуговечности). Слично су објавили Namady et al. (2013), који су приметили да су женке *Ae. albopictus* (потекле од дивљих и лабораторијских лутки) сличних величина испољиле значајне разлике у продукцији јаја између дивљих и лабораторијских популација. Према томе, дужина крила не мора бити у тако чврстој корелацији са продукцијом јаја, упркос налазима да крупније женке продукују више јаја од ситнијих (Blackmore and Lord 2000). Такође је документовано да су женкама привлачнији крупнији мужјаци, који имају бољу виталност и већи репродуктивни капацитет (Yuval et al. 1993).

У прилог поменутом иде налаз да крупнији мужјаци *Ae. aegypti* не само да су живели дуже од ситнијих (Maciel de Freitas et al. 2007), него је и укупан број сперматозоида, изолован из тестиса и семиналних везикула (проширење парног семевода), био значајно виши код крупних него код ситних мужјака исте старосне групе (иако се број сперматозоида по 1 mm дужине крила није значајно разликовао између група мужјака са различитом величина тела), што указује на већи репродуктивни капацитет и виталност крупнијих мужјака (Ponlawat and Harrington 2007).

Mackenzie et al. (1995) су показали да „успешни“ мужјаци *Anopheles gambiae* привлаче женке, док се мужјаци „лошег квалитета“ окупљају око „успешних“ покушавајући да се паре са женкама које долазе, и истакли да успешност мужјака у проналажењу женки (у око 60% случајева) може бити детерминисана пуком случајношћу и/или још увек неидентификованим факторима односно величина мужјака не мора бити пресудна. Према налазима Maïga et al. (2012) мужјаци *An. gambiae* ухваћени током самог чина парења били су значајно крупнији од мужјака који су слободно летели у ројевима. Ипак, Charlwood et al. (2002) нису нашли никакве разлике у величини тела спарених и неспарених мужјака *An. gambiae*; док су се према Crompton et al. (2003) и Ng'habi et al. (2008) мужјаци *An. gambiae* средње величине парили чешће од осталих, вероватно због своје боље окретности приликом летења и бржег контакта са женкама. Последње споменуто је такође утврђено и код мужјака *Baetis bicaudatus* (Ephemeroptera) (Pecharsky et al. 2002). Дакле, чињеница да ситнији мужјаци могу, у неким случајевима, бити бољи у проналажењу женки могла би

евентуално објаснити нижу продукцију јаја у С3 у односу на С2, упркос значајно дужим крилима у С3.

Позната је повезаност асиметрије крила и варијација у успеху парења мужјака (Thornhill 1992, Liggett et al. 1993, Radesäter and Halldórsdóttir 1993). Према наводима више група аутора (Mitton and Grant 1984, Palmer and Strobeck 1986, Parsons 1990, McLachan and Cant 1995, Maïga et al. 2012), асиметричне индивидуе имале су слабију виталност, висок морталитет и успорен развој у односу на мужјаке са симетричним крилима - одабране од стране женки. Пошто је наш експеримент био базиран само на мерењу дужине десног крила, нисмо били у могућности да утврдимо евентуално присуство и утицај асиметрије крила на особине популација у кавезима. Иако би било за очекивати да мужјаци из већих кавеза развију значајно дужа крила током колонизације - услед дужих растојања која треба да прелете, зачуђујуће, мужјаци из најмањег кавеза (С1) имали су најдужа крила. Изгледа да дужина крила у условима једнаке густине комараца по запреминској литри кавеза, није под утицајем потенцијалне приступачности простора, него неких других, још увек непознатих фактора. Такође, преживљавање адулта и продукција јаја биле су више у мањим кавезима (С1 и С2).

Потребно је даље истраживање током продуженог броја генерација да би се утврдило колико би трајао позитиван тренд опоравка, када би била достигнута равнотежа и колико дуго би трајала. Такође, било би корисно употпунити опсервацију продукције јаја дневном стопом инсеминације, као прецизнијим показатељем учинка парења мужјака. Осим тога, било би пожељно испитати промене у симетрији крила и њихову повезаност са осталим параметрима.

## 6.2. Оглед II Испитивање учинка стерилисаних мужјака

Одређивање компетитивности и дуговечности стерилних мужјака *Aedes albopictus* у полу-природним условима представља један од круцијалних и обавезних корака пре отпуштања стерилисаних мужјака у природу. Ово је од изузетне важности за планирање отпуштања стерилисаних мужјака односно одређивање потребног броја стерилних мужјака у односу на број дивљих мужјака и учесталости отпуштања.

Генерално, техника стерилизације инсеката (SIT) умногоме зависи од продукције стерилних мужјака доброг квалитета. Квалитет је осигуран кроз систем биолошких испитивања параметара који одражавају способност инсекта да преживи, да се прилагоди условима који владају у природи, да лоцира женке дивље популације, пари се са њима и оплоди их спермом која је стерилна. Систем контроле квалитета је развијен путем категоризације основних карактеристика преживљавања укључене врсте и њеног понашања при парењу, које следи серија тестова за утврђивање присуства ових карактеристика понашања код масовно узгојених инсеката (што такође служи и као повртна информација за исправљање било каквих проблема у продукцији). Редовна примена тестова која подразумева коришћење система великих кавеза постављених у природу (који креирају услове близу природним), у којима стерилни мужјаци морају да се такмиче са дивљим мужјацима за парење са дивљим женкама, неопходна је за обезбеђивање крајње потврде да су стерилни инсекти способни да испуне своју мисију након отпуштања. Смањена компетитивност може настати услед проблема током узгоја, стерилизације и руковања, као и због урођене некомпатибилности различитих сојева (Calkins and Parker 2005). Стандардизовани лабораторијски тестови често не одражавају прецизно карактеристике и понашање узгојених инсеката у природи (Katsoyannos et al. 1999). Тестови контроле квалитета које је генерално прикладније изводити у великим кавезима са вегетацијом, служе за испитивање: привлачности феромона, компатибилности при парењу и компетитивности стерилних и фертилних мужјака при парењу (Cayol et al. 1999, 2002; FAO/IAEA/USDA 2003). Препоручено је да AW-IPM (Area-Wide Integrated Pest



Management односно стратегија интегрисаног управљања штеточинама на широком подручју) програми отпуштања стерилних инсеката, барем једном годишње врше поређење масовно узгојених инсеката са инсектима циљне популације сакупљеним у природи, у великим кавезима (FAO/IAEA/USDA 2003; Lance and McInnis 2005; Parker 2005).

Густина популације стерилних мужјака у природи, која варира у вези са учесталошћу отпуштања и стопом морталитета стерилних мужјака, не би смела опасти испод нивоа неопходног за одржавање критичног односа тј. односа бројчане доминације стерилисаних мужјака (тзв. „overflooding ratio“ тј. однос преплављености) (Kean et al. 2005). Због тога се учесталост отпуштања и број отпуштених стерилних мужјака морају пажљиво проценити у односу на просечну дуговечност или преживљавање стерилних мужјака, како би се ефикасно избегли периоди са недовољном бројношћу стерилних мужјака у природи. Овде треба нагласити важност процене преживљавања стерилних мужјака у природном станишту (Vreysen 2005), пошто је њихово стварно преживљавање у природи, често драстично ниже него у заштићеним условима великих кавеза, где стерилни мужјаци могу имати лак приступ храни, а и заштићени су од предатора (Hendrichs et al. 1993). Осим тога, услови масовног узгоја често ненамерно доприносе селекцији јединки кратког животног века (Caouol 2000). Краћи животни век стерилних мужјака, иако није директан показатељ компетитивности, често условљава потребу њиховог учесталијег отпуштања, те стога може значајно утицати на повећање трошкова програма, у поређењу са стерилним инсектима дужег века (Hendrichs et al. 2005).

### **6.2.1. Почетни морталитет мужјака**

Процент лутки мужјака који успешно заврше еклозију (прелазак из стадијума лутке у стадијум одраслог односно излетање), дефинише број одраслих који могу бити отпуштени (Calkins and Parker 2005). У складу са овом чињеницом, у израчунавање почетног морталитета мужјака укључили смо угинуле лутке, угинуле одрасле који нису успешно завршили еклозију и одрасле угинуле на површини воде, који су завршили еклозију, али нису могли да лете. Ови мужјаци су, заправо, јединке које би биле изгубљене за SIT

програм (Calkins and Parker 2005), те је тако информација о проценту почетног mortalитета мужјака веома корисна и неопходно ју је одредити пре отпуштања мужјака у природу.

Осим тога, пошто mortalитет мужјака (нарочито у касној фази стадијума лутке и раној фази стадијума одраслог) може бити показатељ квалитета мужјака, у нашем експерименту је било веома важно упоредити почетни mortalитет мужјака различитих коришћених *Ae. albopictus* сојева, да би се могао одредити квалитет сваког од њих. У контроли је коришћен само LAB сој (RER F8, F9), док су у третману коришћена два соја: LAB (Rimini F52, F53, F54) и WILD (Crevalcore F0).

У тунелима за тестирање компетитивности, мужјаци LAB соја су испољили значајно виши почетни mortalитет у односу на мужјаке WILD соја, и он је био израженији ( $p < 0,01$ ) приликом поређења 30 Gy стерилисаних мужјака, него приликом поређења фертилних мужјака ( $p < 0,05$ ). С друге стране, унутар истог соја нису уочене значајне разлике у почетном mortalитету стерилисаних и нестерилисаних мужјака. Ово је у складу са налазима Balestrino et al. (2010) који су констатовали да није било значајних разлика у дуговечности мужјака *Ae. albopictus* (тестиран је сој Rimini F23) између нестерилисаних мужјака (односно контроле) и 20, 30 и 40 Gy стерилисаних мужајака.

Значајне разлике у почетном mortalитету различитих сојева *Ae. albopictus*, уочене у нашем експерименту, могу бити последица различитих особина сојева. То би могло значити да су мужјаци WILD соја били толерантнији на стрес и соматска оштећења, узрокована 30 Gy стерилизацијом и експерименталним манипулацијама, у поређењу са мужјацима LAB соја. Овај феномен може бити узрокован дуготрајном колонизацијом LAB соја коришћеног у третману (Rimini, генерације F52, F53 и F54), за разлику од WILD соја који је коришћен без иједне лабораторијске генерације. Селекција током колонизације и масовни узгој, нормално мењају биологију и понашање инсеката (Iwahashi et al. 1983; Calkins 1989; Miyatake 1993, 1998a, 1998b, 2002; Miyatake and Haraguchi 1996; Miyatake and Yamagishi 1999; Cayol 2000; Shimoji and Miyatake 2002; Maor et al. 2004 у Dyck et al. 2005). У масовном узгоју услови су константни и оптимални (осветљење, температура, релативна влажност, квалитет и квантитет хране, и друго). Излагање оваквим условима

(нарочито ако су инсекти гајени током дугог низа генерација) може селектовати јединке које су добро прилагођене лабораторијским условима, али им недостаје способност прилагођавања променљивом природном окружењу (Caouol 2000). Ово је могло узроковати уочени виши почетни морталитет мужјака LAB соја, који могу бити осетљивији на различите експерименталне манипулације, стерилизацију, као и на полу-природне услове у тунелима (укључујући неконстантну и неоптималну температуру током еклозије лутки) у поређењу са WILD сојем, чије су јединке генерално природно селектоване тако да буду прилагодљиве мноштву различитих променљивих и „неочекиваних“ услова.

Осим тога, да би се тестирао квалитет другог *Ae. albopictus* LAB соја (RER F8, F9), који је коришћен само у контроли (2012. год.), и упоредио његов почетни морталитет мужјака са поменутих LAB и WILD сојевима коришћеним у третману (2013. и 2014. год.), било је неопходно посматрати искључиво почетни морталитет фертилних мужјака (пошто су у контролне тунеле интродуковане искључиво фертилне лутке мужјака).

Такво поређење је показало да постоје значајне разлике у почетном морталитету фертилних мужјака између контроле (2012. год., сој RER) и третмана (обе године заједно 2013. + 2014. год.) у случајевима када су у третману посматрани збирно LAB (Rimini) и WILD сојеви, као и када је вршено поређење искључиво са LAB (Rimini) сојем из третмана; док поређење само са WILD сојем није испољило значајност. Међутим, у циљу што прецизнијег тумачења добијених резултата биле су потребне још детаљније информације, те је извршено и тестирање по годинама експеримента.

Почетни морталитет фертилних мужјака LAB сојева није показао значајне разлике између 2012. год. (сој RER) и 2013. год. (сој Rimini), док је током 2014. год. био значајно виши (сој Rimini) у поређењу са претходне две године. Пошто је током 2013. и 2014. год. коришћен исти LAB сој (Rimini), а и експериментални дизајн је био исти, могуће је да је током 2014. год. неки неконтролисани екстерни (спољашњи) фактор узроковао значајно виши почетни морталитет фертилних мужјака, у односу на 2013. год. Такође је утврђено да је почетни морталитет фертилних мужјака WILD соја регистрован у 2014. год., био значајно виши него код LAB соја у 2012. год. (док се посматрани параметар у случају WILD соја у 2013. год. није значајно разликовао од LAB соја у 2012. год.), што потврђује могућност утицаја неконтролисаног фактора током 2014. год. Међутим, интересантно је

да када су посебно посматрани фертилни мужјаци искључиво WILD соја, тај фактор се није битније одразио на њихов почетни морталитет (с обзиром да нису уочене значајне разлике између 2013. и 2014. год.). Ово може ићи у прилог квалитету WILD соја, који је, очигледно, био генерално резистентнији на било који од могућих фактора који су испољили штетан утицај на мужјаке LAB соја (укључујући и тај претпостављени неконтролисани екстерни фактор). Уочени феномен је вероватно повезан са процесом колонизације LAB соја и бројем генерација у „заточеништву“, што води смањењу отпорности на стресне услове.

### **6.2.2. Почетни морталитет женки, стопа исхране крвљу, спремност комараца за репродукцију**

Морталитет женки (укључујући и угинуле лутке и угинуле одрасле) је први пут регистрован у кавезима који су држани у комори са контролисаним условима (и то три дана након интродукције издвојених лутки женки, које су смештене у кавезе ради излетања одраслих). Међутим, подаци о овом морталитету су служили искључиво као неопходна информација за замену угинулих женки адекватним бројем живих (непосредно пре њихове интродукције у тунеле) односно да би у сваки тунел било интродуковано по 100 одраслих женки, те се тако испоштовали захтеви експерименталног протокола.

Три дана након интродукције женки у тунеле, непосредно пре нуђења крвног obroка, број угинулих женки је поново регистрован, проверавањем унутрашњости кавеза који су служили за њихову интродукцију у тунеле. Одлучено је да за ту проверу морталитета буде коришћен израз: „почетни морталитет женки“, што би одговарало провери почетног морталитета мужјака изведеној истог дана. Дакле, употреба термина: „почетни морталитет“ се у нашем експерименту односи искључиво на читавање морталитета јединки које су интродуковане у тунеле (без обзира што су мужјаци интродуковани у стадијуму лутке, а женке у стадијуму одраслог).

Регистровани почетни морталитет женки је био веома низак (током целог експеримента констатоване су свега две угинуле женке у тунелима). Ова информација је била веома драгоцену приликом тумачења резултата, јер је одагнала сумњу да ли је довољно женки

било живо током нуђења крвног оброка, те да ли је број уинулих женки утицао на вредност стопе исхране крвљу.

Међутим, без обзира на високу бројност присутних живих женки у тунелима (што би водило очекивању да ће велики део њих узети понуђени крвни оброк) стопа исхране крвљу није била висока и кретала се у опсегу од 5 до 62%. Уочена појава може бити повезана са неопходним периодом који мора проћи од излетања женки (прелазак из лутке у одраслог) до узимања првог крвног оброка, а чија дужина зависи од температуре (Delatte et al. 2009). Према овим ауторима, то обично траје између 4,2 и 15 дана, при чему се минималан потребан период дешава на температури од 30 °C, док се на температурама изнад и испод 30 °C тај период продужава. Del Rosario (1963) је презентовао ниже вредности поменутог периода, односно око 2 до 3 дана на 25 °C. У нашем експерименту, одрасле женке су провеле отприлике један дан на 28 °C, у малим кавезима у комори са контролисаним условима, пре него што су биле интродуковане у тунеле, у којима су провеле још три дана у полу-природним условима (коегзистирајући са стерилним и фертилним одраслим мужјацима, због парења) пре него што им је понуђен крвни оброк. Пошто су, током нашег експеримента, просечне дневне температуре испољиле високе варијације, могуће је да је услед ове чињенице женкама био потребан дужи период који мора да прође од излетања до узимања првог крвног оброка (односно период дужи од четири дана, колико су имале на располагању). Ово је могло утицати на изражене варијације регистрованих стопа исхране крвљу, које су у појединим случајевима биле изузетно ниске.

Осим тога, комарци нису спремни за репродукцију одмах након излетања. Мужјацима је потребан отприлике један дан за ротацију гениталија, пре него што постану полно зрели (Klowden 1990; Briegel unpublished data in Brigel et al. 2001, Oliva et al. 2011) и способни за парење. Ова особеност је узета у обзир у нашем експерименталном протоколу, те су женке интродуковане у тунеле три дана након интродукције лутки мужјака, како би сви мужјаци имали довољно времена да постану спремни за парење. Поврх тога, овај довољно дуг период је онемогућио коришћење компетитивне предности стерилисаних мужјака у односу на фертилне, с обзиром да је период неопходан за излетање свих стерилисаних мужјака краћи него код фертилних (Bellini et al. 2013b), као и због тога што стерилисани мужјаци раније завршавају ротацију гениталија (Oliva et al. 2011), те тако могу почети са

парењем неколико сати раније у односу на фертилне мужјаке (Oliva et al. 2012a, Bellini et al. 2013b). Осим тога, мужјаци *Ae. albopictus* испољавају највишу активност парења у периоду између 48 и 72 сата након излетања (Leahy and Craig 1967), што је, такође, било у складу са нашим експерименталним протоколом (односно одабир тренутка интродукције женки у тунеле био је прилагођен моменту највеће спремности и мужјака и женки за парење).

Женкама комараца је такође потребан изврстан период, који мора проћи између излетања и инсеминације. Према Edman et al (1972), женке *Ae. taeniorhynchus* су генерално биле старе 30-40 сати пре него што су биле инсеминирани, док су Trajer et al. (2017) израчунали да је за *Ae. albopictus* тај минималан потребан период 1,5 дана (36 сати), те такође саопштили да је овај период потребан и осталим врстама рода *Aedes*. Генерално, женке *Ae. albopictus* копулирају два до три дана након излетања, да би, потом, инсеминирани женке почеле са тражењем домаћина кичмењака да би узеле крвни оброк (Macdonald 1956, del Rosario 1963, Mori and Wada 1977, Lima Samara et al. 2014). Варење крви активира развој јајника, женке се сматрају гравидним, и спремне су за овипозицију три дана касније (Lima Samara 2007, 2014). Ипак, неспарене женке, такође могу узети крвни оброк пре копулације (Klowden 1999) или се копулација може одиграти чак и током самог узимања крвног obroка, мада су такве могућности ређе. Oliva et al. (2012a) су презентовали да је, у просеку, 93% женки *Ae. albopictus* било инсеминирано након 48 сати (тј. дошло је копулације у том периоду), када су биле смештене у мале лабораторијске кавезе, са 1 или 5 дана старим фертилним или стерилним мужјацима. Током парења, додатне жлезде мужјака комараца рода *Aedes* продукују материје које бивају пренете женкама и које мењају извесне аспекте физиологије и понашања женки, те тако нпр. утичу на њихову потрагу за домаћином и предовипозиционо понашање (Klowden 1996, 1999). Дакле, статус инсеминираниости женки је такође могао утицати на ниво стопе исхране крвљу у нашем експерименту.

Алтернативно, друга могућа објашњења за ниску стопу исхране крвљу могла би подразумевати евентуалан морталитет младих женки (након успешног излетања из кавеза за интродукцију, те зато нису регистроване у њима током читавања морталитета) услед утицаја полу-природних услова или је, пак, „заточеништво“ у тунелу утицало на понашање женки, те су стога избегавале узимање крвног obroка.

У сваком случају, уочене вредности стопе исхране крвљу указују на потребу адаптације протокола, у циљу добијања што поузданијих резултата у будућим екпериментима детерминације компетитивности стерилних мужјака у полу-природним условима. Стога би било неопходно наћи начин да се повећа број женки које ће узети крвни оброк, што би последично повећало број положених јаја по тунелу (што би водило обезбеђивању обимнијег узорка јаја за одређивање стопе пиљења, као и много поузданијим резултатима за одређивање ефикасности стерилних мужјака). Дакле, у будућности би требало променити екпериментални дизајн, пошто се осетљивост примењеног метода није показала довољно добром за утврђивање могућих разлика између тестираних мужјака. Једно од могућих решења могло би бити повећање броја женки по тунелу (тј. интродуковање више женки, нпр. 200) што би повећало број женки које би узеле крвни оброк по тунелу и последично број положених јаја по тунелу.

Такође би могло бити вредно покушаја нуђење крвних оброка током два узастопна дана, како би више женки било спремно за узимање свог првог крвног obroка у тренутку када је он понуђен (у случају да је температура одступала од оптималне током периода пре првог крвног obroка), као и да би се обезбедило више инсеминираних женки (пошто оне генерално много радије узимају крвни оброк).

### **6.2.3. Број јаја по тунелу, фекондитет и фертилитет, капацитет за индуковање стерилитета (CIS Index) и компетитивност мужјака (Fried's Competitiveness Index)**

Варијације у стопи исхране крвљу по тунелу, током нашег екперимента, неминовно су се одразиле на укупан број јаја положених по тунелу, што је последично водило високој варијабилности између понављања у оквиру исте комбинације третмана, као и унутар контроле (иако нису уочене значајне разлике нити у случају међусобног поређења контроле и различитих комбинација третмана, нити искључиво између тунела са различитим комбинацијама третмана). Висока варијабилност је такође уочена и код фекондитета (број положених јаја по крвљу нахрањеној женки), пошто је он израчунат као однос укупног броја положених јаја по тунелу и броја крвљу нахрањених женки по тунелу. У сваком случају, број јаја по крвљу нахрањеној женки у тунелима за испитивање

компетитивности кретао се у распону од  $45,04 \pm \text{SEM } 13,03$  до  $70,61 \pm 5,11$  (просечно  $58,21 \pm 7,76$  јаја по женки, од укупно 15 понављања). Поређење фекондитета уоченог у нашим тунелима за испитивање компетитивности са осталим студијама испитивања компетитивности *Ae. albopictus* у полу-природним условима (када су мужјаци такође били стерилисани дозом од 30 Gy) показало је да су, у зависности од студије, сличности биле изражене више ( $60,83 \pm 14,24$  јаја по женки, оглед је укупно изведен у 16 понављања коришћењем различитих комбинација сојева) (Bellini et al. 2013b) или мање ( $52,35 \pm 6,31$  јаја по женки, оглед је изведен у 5 понављања, а коришћена је иста комбинација сојева) (Puggioli et al. 2016). Фекондитет је у нашим контролним тунелима био  $39,07 \pm 4,06$  јаја по женки (просек од 4 понављања), док је у истраживањима поменутих група аутора био виши. Тако је у Puggioli et al. (2016) износио  $46,85 \pm 10,28$  јаја по женки (просек од 5 понављања), док је у Bellini et al. (2013b) био  $52,12 \pm 2,12$  јаја по женки (просек од 16 понављања).

Генерално, број јаја *Ae. albopictus* положених по једном гонотрофичком циклусу обично се креће у распону од 30 до 80 (Delatte et al. 2009, Basuki et al. 2010, Erickson et al. 2010, Aida et al. 2011, Gubler 1970b, Xue et al. 2009, Dieng et al. 2010, Waldock et al. 2013) и у позитивној је корелацији са величином тела женке (која највише зависи од квалитета и квантитета исхране током стадијума ларве). Стога је фекондитет обично виши у лабораторијском узогоју, док је у природи вероватније да буде ближи доњој граници овог опсега (услед неповољнијих услова, у поређењу са лабораторијом) (Hawley 1988, Waldock et al. 2013). Осим тога, иако трајање неопходног периода који мора проћи од излетања женке до узимања првог крвног obroка зависи од температуре (Delatte et al. 2009), што је могло утицати на стопу исхране крвљу у нашем експерименту (заједно са осталим факторима, као што су бројност инсеминираних женки пре нуђења крвног obroка, или могућа изгладнелост женки односно доступност осталих извора енергије у тунелима), утврђено је да број положених јаја по гонотрофичком циклусу независан од температуре (Delatte et al. 2009).

У сваком случају, најважнији параметри у смислу процене учинка SIT-а су ниво компетитивности стерилних мужјака (изражен кроз Fried-ов индекс компетитивности, у даљем тексту Fried индекс) и њихов капацитет за индуковање стерилитета у циљну



популацију (изражен кроз CIS индексе). За израчунавање ових индекса потребни су подаци о стопи фертилитета јаја (односно процентуалној вредности односа испиљених јаја и укупног броја положених јаја) како из контролних, тако и из тунела из третмана. За израчунавање Fried индекса додатно је потребан и податак о резидуалном фертилитету стерилних мужјака чија је просечна вредност у нашем експерименту износила 2,82%. Осим тога, важно је напоменути да током нашег експеримента, приликом израчунавања CIS и Fried индекса нису узете у обзир вредности почетног морталитета мужјака (тј. подразумеван је укупан број интродукованих стерилних и фетилних мужјака односно 100:100), пошто је почетни морталитет мужјака заправо индиректно укључен у израчунате вредности двају индекса.

У вези са проценом свих поменутих параметара (броја јаја/тунелу, броја јаја/женки, стопи пиљења јаја (фертилитету), CIS и Fried индекса) важно је истаћи да нису констатоване никакве индикације, нити докази о некомпатибилности при парењу различитих сојева (RER, Rimini, Crevalcore) коришћених у овом експерименту, што је био један од предуслова извођења огледа. Из тих разлога је овај фактор био детерминисан пре наше студије, од стране Bellini et al. (2013b), који су одржавали поменуте сојеве у лабораторијским условима током неколико генерација, како би одредили стопе њиховог преживљавања, парења и пиљења. Ово је било од изузетне важности, јер у случају да је дугорочни масовни узогој индуковао извесну некомпатибилност између сојева, то би могло произвести одступања и непрецизности у посматраним резултатима (Dyck et al. 2005).

Стопа фертилитета јаја била је, као што је и очекивано, највиша у контроли ♂LAB\_ ♀LAB (89,05%), значајно различита од друге комбинације третмана ♂LAB 30 Gy : ♂WILD\_ ♀LAB (39,16%,  $p < 0,05$ ) и високо значајно различита од четврте комбинације третмана ♂WILD 30 Gy : ♂LAB\_ ♀LAB (33,26%,  $p < 0,01$ ). Преостале две комбинација третмана (♂LAB 30 Gy : ♂WILD\_ ♀WILD и ♂WILD 30 Gy : ♂LAB\_ ♀WILD) нису испољиле значајне разлике у поређењу са контролом. Ипак, пошто није уочена значајна разлика у стопи фертилитета јаја између различитих комбинација третмана, не би се могло рећи да су две комбинације сојева са значајно нижим стопама фертилитета јаја у односу на контролу, дале боље резултате у смислу примене SIT-а, него друге две комбинације.

Поред тога, иако CIS и Fried индекси нису испољили значајне разлике између комбинација третмана, њихови распони су обухватили вредности испод и изнад 1 (CIS: од 0,73 до 1,79 (просечно 1,18), и Fried: од 0,78 до 1,97 (просечно 1,28)) од укупно 15 изведених понављања.

Према FAO/IAEA/USDA (2003) и Helinski (2008b) вредности Fried индекса око 1 указују на једнаку конкуритивност стерилних (третираних) и фертилних мужјака; вредности испод 1 указују на смањену конкуритивност стерилних у поређењу са фертилним мужјацима; док вредности изнад 1 сугеришу бољу конкуритивност стерилних мужјака, у односу на фертилне. Добијени резултати у нашем експерименту су вероватно били само ствар варијабилности, и требало би бити изведено много више понављања да би се, са сигурношћу, могло утврдити која комбинација третмана је учинковитија (у овом експерименту су за три комбинације третмана изведене по четири понављања, док су за последњу комбинацију изведена три понављања).

У сваком случају, Bellini et al. (2013b) су објавили да су просечни CIS и Fried индекси за *Ae. albopictus* мужјаке стерилисане дозом од 30 Gy били 0,96 и 1,00 (када се посматрало 16 понављања), што је веома слично нашем експерименту; док су за мужјаке стерилисане дозом од 40 Gy, ови индекси износили 0,71 и 0,72 (када се посматрало 37 понављања). Ова група аутора је пријавила да су уочене разлике у CIS индексима између мужјака стерилисаних дозама од 30 Gy и од 40 Gy биле врло близу достизања статистичке значајности. Резидуални фертилитет мужјака старих 3-4 дана, коришћених у њиховом експерименту, био је знатно виши код мужјака стерилисаним дозом од 30 Gy (4,37%), него дозом од 40 Gy (0,82%); али су мужјаци стерилисани са 30 Gy, испољили знатно вишу конкуритивност у односу на мужјаке стерилисане са 40 Gy, услед мањих соматских оштећења која настају услед зрачења (Bellini et al. 2013b). Другим речима, постизање скоро потпуног или потпуног стерилитета мужјака *Ae. albopictus* путем употребе високих доза радијације од 40 Gy и 60 Gy или виших доза код осталих врста комараца (Balestrino et al. 2010), на рачун великог смањења конкуритивности, није најбоља стратегија (Parker and Mehta 2007, Robinson et al. 2009). Према томе, резидуални фертилитет мужјака регистрован у нашем експерименту (2,82%) као и констатоване вредности CIS и Fried индекса (у просеку је сваки био око 1 (тј. 1,18 и 1,28)) били су веома задовољавајући (стерилни мужјаци су били приближно једнако конкуритивни у односу на фертилне), и у

складу су са опсервацијом Robinson et al. (2009) који су дефинисали индуковани стерилитет у женкама у природи, као производ индукованог стерилитета у мужјацима и њихове компетитивности у природи.

Неке групе аутора (Madakacherry et al. 2014, Oliva et al 2012a) одабрале су дозу од 35 Gy као веома погодну за стерилисање мужјака *Ae. albopictus*, али се ове благе разлике у препорученим дозама, коришћеним у различитим студијама, тешко могу адекватно упоредити, пошто оне такође могу бити под утицајем спољашњих фактора, као што су опрема за ирадијацију и услови коришћења током ирадијације (Oliva et al. 2012a). У сваком случају, ако су доза и период ирадијације оптимизовани, потенцијални штетни ефекти могу бити минимизовани (Andreasen and Curtis, 2005).

Занимљиво, најефикаснија доза стерилизације за *Ae. albopictus* креће се у опсегу од 30 до 35 Gy, што је прилично ниско у поређењу са осталим врстама комараца, као што је приказано у Balestrino et al. (2010), који су објединили налазе више група аутора. На пример, код *Anopheles albimanus* употреба X зрачења на луткама старим 24 сата проузроковала је 88,7% стерилитета када је доза била 70 Gy и 100% стерилитета када је доза била 80 Gy (Ali and Rozenboom 1972); код лутки мужјака *An. gambiae* различите старости, 99,5% стерилитета је било индуковано гама зрачењем при дози од 120 Gy (Andreasen and Curtis 2005); код лутки мужјака *Culex pipiens molestus* старих два дана постигнут је стерилитет од 99,1% при дози ирадијације од 97,3 Gy коришћењем гама зрачења (Sonoda 1972) итд., док су најсличнији подаци пријављени за *Ae. aegypti*, када се излагањем лутки мужјака старих један дан постигло 100% стерилитета при дози од 70 Gy (Hallinan and Rai 1973), што се не разликује много од доза >60 Gy, пријављених за *Ae. albopictus* од стране Balestrino et al. (2010) за исти ниво стерилитета.

Требало би поменути да су студије о *Ae. albopictus*-у, показале да виша доза ирадијације (>40 Gy) примењена на лутке, обично води скраћењу дуговечности мужјака (која се при истој дози ирадијације може значајно разликовати, у зависности од коришћеног соја), мада се, генерално, при било којој дози ирадијације, дуговечност мужјака повећава у складу са старошћу лутки у моменту ирадијације (Balestrino et al. 2010).

#### 6.2.4. Просечна дневна стопа преживљавања и њене корелације са метеоролошким факторима

Сазнања о преживљавању мужјака и капацитету дисперзије у природи су од фундаменталног значаја за развој SIT програма (Bellini et al. 2010), док су информације о дуговечности женки и њиховом преживљавању (дневна стопа преживљавања) важне детерминанте (одреднице) векторског капацитета (Maciel-de Freitas et al. 2008).

У сваком случају, температура је најутицајнији параметар популационе динамике *Ae. albopictus* (Alto and Juliano 2001), и дејствује заједно са осталим факторима животне средине као што су релативна вжажност (RH) и падавине (Focks et al 1994). У нашој студији су тестиране могуће корелације просечне дневне стопе преживљавања (SR) *Ae. albopictus* и различитих метеоролошких фактора (средња дневна температура, просечна максимална и минимална дневна температура, апсолутна максимална и минимална температура за сваки период, средња дневна RH), током различитих експерименталних периода у полу-природним условима. Корелације су одређене засебно за оба пола и у складу са коришћеним сојем (код свих женки, и мужјака у контроли) или комбинацијом сојева (код мужјака у третману). Осим тога, услед техничких изазова у експерименталном дизајну и извесних спречициности које су се појавиле током експеримента у већини случајева није било могуће обезбедити упоредиве SR податке за оба соја/комбинације сојева и оба пола у истом посматраном периоду, иако је било могуће генерално израчунати поменути корелације. И управо због прилично оскудног броја SR података (за израчунавање поменутих корелација), одлучено је да се утврђене SR вредности лабораторијских сојева (RER у 2012. (контрола) и Rimini у 2013. и 2014. год (третман)) третирају као вредности јединственог LAB соја, како би се обезбедио довољно дуг низ података неопходних за утврђивање жељених корелација.

У сваком случају, просечне дневне стопе преживљавања су у свим посматраним случајевима биле веома сличне (у просеку око 0,72). Просечна дневна стопа преживљавања мужјака која је садржавала фертилне мужјаке LAB соја (из контроле и комбинације сојева: ♂WILD 30 Gy : ♂LAB), кретала се у опсегу од 0,66 до 0,84 (у просеку 0,72); док се SR мужјака која је садржавала фертилне мужјаке WILD соја (тј. из комбинације сојева ♂LAB 30 Gy : ♂WILD) кретала од 0,62 до 0,79 (у просеку 0,70).

Приликом посматрања женки, SR је у оба случаја у просеку била по 0,72 (варирала је од 0,60 до 0,88 код LAB женки и од 0,61 до 0,77 код WILD женки). Уочене просечне SR вредности за оба пола су знатно ниже у поређењу са налазима Bellini et al. (2013b), који су за мужјаке забележили SR вредност од 0,93 (када су обједињено посматрани фертилни мужјаци и стерилисани мужјаци (озрачени дозом од 30Gy)); док је SR фертилних женки била 0,95, такође у полу-природним условима. Ова разлика би могла бити објашњена различитим трајањем периода који претходи завршетку огледа и сакупљању свих живих одраслих (што је у њиховом експерименту наступало након 5, 11, 13, 14 или 18 дана од интродукције лутки мужјака, док је у нашем експерименту то било након 14 дана), што је могло утицати на различите нивое прецизности израчунавања; мада би такође могла бити повезана и са различитим температурама и RH током ова два експеримента. У сваком случају, вредности наших резултата, улазе у оквир пријављених вредности дневне стопе преживљавања мужјака *Ae. albopictus* (распон од 0,52 до 0,97) регистрованих у урбаним подручјима северне Италије (Bellini et al. 2010).

Поврх тога, веома сличне просечне стопе преживљавања за оба пола, добијене у нашем експерименту, односно за све мужјаке 0,71 и за све женке 0,72 (што је у супротности са подацима о преживљавању објављеним од стране Delatte et al. (2009), који су приказали много дужи животни век женки у лабораторијским условима), могу бити повезане са различитим навикама у летењу мужјака (углавном се роје у специфичним позицијама и ретко ударају у мрежу тунела) и женки (склоније су дисперзији, те стога често ударају у мрежу, што узоркује стрес и оштећења) у полу-природним условима (Bellini et al. 2013b). У сваком случају, преживљавање стерилних инсеката до репродуктивног доба је нарочито критично (Dowell et al. у Dyck et al. 2005). Редукција дуговечности може бити пропратни, нежељени ефекат масовног узгоја, селекције сојева, стерилизације, руковања и метода отпуштања (Fay and Meats 1987, Meats 1998 у Dyck et al. 2005), иако треба истаћи да су многи аутори демонстрирали постојање веома сложеног односа између температуре, RH и преживљавања (Hawley 1988, Dickerson 2007).

Занимљиво је да је тестирање могућих корелација дневних стопа преживљавања и метеоролошких фактора у нашем експерименту, показало статистичку значајност ( $p < 0,05$ ) једино у случају женки WILD соја (врло високу/високу и негативну за све посматране температурне параметре, и високу и позитивну за RH). Ово је важно нагласити, јер су у

једној од две тестиране комбинације сојева мужјака, која је садржавала фертилне WILD мужјаке (тј. у ♂LAB 30 Gy : ♂WILD), у четири од шест случајева испитиване корелације такође биле врло високе/високе, али не и значајне. У сваком случају, експериментални дизајн није дозволио засебно одређивање просечних дневних стопа преживљавања фертилних или стерилних LAB и WILD мужјака из истог тунела, него само укупну SR за одређену комбинацију сојева, те стога није било могуће тестирати њихове појединачне корелације са метеоролошким факторима.

Но, без обзира на то, на основу значајних корелација SR и метеоролошких фактора утврђених у случају женки WILD соја, могло би се претпоставити да је WILD сој поново другачије реаговао, у поређењу са LAB сојем, те испољио различит одговор на метеоролошке факторе. Ово може бити објашњено чињеницом да WILD сој није био подвргнут колонизацији, те, самим тим, његово понашање и одговор могу бити боље прилагођени промењивим условима животне средине.

Поврх тога, с обзиром да су мужјаци и LAB (RER и Rimini) и WILD (Crevalcore) сојева били изложени стресним условима узрокованим експерименталном манипулацијом (важи за сва три соја) и ирадијацијом од 30 Gy (важи за сојеве: Rimini и Crevalcore), таква врста утицаја могла је прикрити могући одговор мужјака на метеоролошке факторе или, пак, изазвати његова одступања, што је резултовало изостанком значајних корелација у обе посматране комбинације сојева мужјака.

Уочене значајне корелације женки WILD соја су у складу са подацима пријвљеним од стране Delatte et al. (2009), који су показали да је стопа преживљавања одраслих *Ae. albopictus* на Ријунион острву (коришћене су генерације: F2 и F3) била у негативној корелацији са температуром, при чему је највиша стопа преживљавања била на 15 °C, а најнижа на 35 °C. Сличне резултате су добили Monteiro et al. (2007) у североисточном Бразилу, за сој *Ae. albopictus* који се још увек није прилагодио тенденцији пораста средњих дневних температура, које у летњем периоду често достижу 35 °C.

Преживљавање комараца се такође може разликовати географски, услед варијација у генетичком пореклу локалних популација комараца (Brady et al. 2013), иако се популације *Ae. albopictus* такође могу постепено прилагођавати на широки распон услова животне средине (Monteiro et al. 2007, Waldoк et al. 2013). Последња група аутора је показала да су европске популације ове врсте нађене у регионима у којима је RH током лета била свега

35%, што указује на широки опсег вредности релативне влажности у којем ова врста може преживети. Поврх тога, треба нагласити да се унутар RH опсега од 60 до 90% углавном опажају тек незнатне разлике у преживљавању одраслих *Ae. albopictus* (Delatte et al. 2009, Calado et al. 2002, Briegel and Timmermann 2001, Lowenberg and Navarro-Silva 2004, Alto and Juliano 2001). У сваком случају, проучавање ефеката релативне влажности на преживљавање одраслих је компликовано, с обзиром да је RH повезана са температуром (Waldock et al. 2013).

Пошто температуре изнад 35°C (које су све чешће током јула и августа у средњој и јужној Европи) имају негативан утицај на преживљавање одраслих, једна од идеја која би могла допринети извесној предности у SIT апликацији, била би селекција *Ae. albopictus* соја прилагођеног вишим температурама (као и екстремним температурним распонима) односно мужјака који би били издржљивији и толерантнији у односу на WILD мужјаке. Осим тога, било би веома драгоцену прибавити податке о утицају температурних варијација на динамику *Ae. albopictus*, мада према Waldock et al. (2013), до данас није изведена ни једна студија о овој теми. Генерално, што су инсекти дуже гајени у лабораторији, то им је нижа толеранција на температурне осцилације (особина позната као отпорност на топлотни стрес) што је потврђено и у недавно објављеном раду Hoffmann and Ross (2018), и представља информацију од изузетног значаја при одабиру одговарајућег соја за SIT апликацију у природи.

#### **6.2.5. Корелације температурних параметара и укупног почетног морталитета фертилних мужјака**

Изузев тестирња корелација просечне дневне стопе преживљавања и различитих метеоролошких фактора, такође су испитиване и могуће корелације укупног почетног морталитета фертилних мужјака и температурних параметара током првих 6 дана (тј. од интродукције лутки мужјака до читавања почетног морталитета),

Иако током овог експеримента, није мерена температура воде (у кантицама за интродукцију лутки мужјака), постоји добра корелација између температуре ваздуха и

температуре воде. Према Alto and Juliano (2001) појединачна мерења температуре воде не могу прецизно описати дневне термо-периоде, али су, ипак, температура воде (у малим рецепијентима воде) и просечна температура ваздуха сличне. Овај однос такође може бити и нелинеаран, у зависности од величине и локације рецепијента воде (Paaijmans et al. 2010, Paaijmans and Thomas 2011). Alto and Juliano (2001) су такође показали да недељне температуре воде у ларвалним стаништима *Ae. albopictus* могу бити око 0–5 °C више од температуре околног ваздуха или веома близу те вредности (у зависности од типа станишта), и констатовали да је дневна температура околног ваздуха била блиско повезана са недељним температурама воде.

Преживљавање лутки *Ae. albopictus* на различитим температурама је прилично конзистентно у свим студијама, са приказаним оптималним преживљавањем на 25–30 °C и високим морталитетом при температурама нижим од 15 °C и вишим од 36 °C. Уопштено, стопе морталитета јувенилних стадијума се знатно повећавају при екстремним температурама. Температуре изнад 40 °C су генерално прихваћене као граничне за јувенилне стадијуме (што се углавном се односи на јаја и ларве), док је за преживљавање лутки процењено да престаје на 10 и 37 °C (Delatte et al 2008, Lee 1994b). Поред тога, лутке су посебан и изузетан стадијум развоја комараца. Трајање њиховог преласка из акватичног стадијума до стадијума одраслог који лети, такође зависи од температуре, а време потребно за развој лутке код *Ae. albopictus* може варирати, крећући се у распону од 8,5 до 1,7 дана на температури између 15 и 36 °C, при чему није уочена разлика између тропских и умерених сојева (Waldock et al. 2013). Према Monteiro et al. (2007) укупно трајање стадијума лутке је било најкраће на константној температури од 30 °C ( $1,7 \pm 0,20$  дана), а потом на констанних 25 °C ( $2,5 \pm 0,30$  дана) или на промењивим температурама животне средине које су се кретале у распону од 25 до 29 °C ( $2,3 \pm 0,30$  дана). Осим тога, према Waldock et al. (2013), најкраћи развој лутке се дешава при температурама у опсегу од 30 до 36 °C, и ова опсервација је заснована на обједињеним резултатима добијеним од стране великог броја аутора (Hawley 1988, Lee 1994b, Delatte et al. 2009, Tseng and Wu 1951, Udaка 1959, Livingstone and Krishnamoorthy 1985, Hien 1975, del Rosario 1963, Calado and Silva 2002, Galliard and Golvan 1957, Galliard 1958, Halcrow 1955, Briegel and Timmermann 2001).



Изненађујуће, током нашег експеримента нису уочене значајне корелације између посматраних температура ваздуха (средња дневна температура, просечна максимална и минимална дневна температура) током првих 6 дана и почетног морталитета фертилних мужјака (укључујући сва три коришћена соја), ни у случају када су засебно посматране три експерименталне године, нити током свих година заједно односно током 11 експерименталних периода. Ово може бити објашњено чињеницом да се прикупљени званични подаци о различитим метеоролошким факторима (који су коришћени за израчунавање корелација) односе на Borgo Panigale (предграђе Болоње удаљено ваздушном линијом 24,08 km од Crevalcore-а где је извођен експеримент), а микроклиматски параметри могу варирати чак и између тунела (постављених на различитим позицијама), а поготово између различитих локалитета. Друго могуће објашњење би могло бити да је број података чије је корелације требало испитати био превише оскудан, било би потребно обезбедити већи узорак како би се обезбедили прецизнији и поуздани подаци о корелацијама.

Међутим, занимљиво је да је када су тестиране корелације које се односе искључиво на периоде са значајним разликама у температурама и почетни морталитет фертилних мужјака током њих, констатована значајна корелација у случају просечне MAX дневне температуре (умерена и негативна). Уочени резултат (виша просечна MAX дневна  $t \gg$  нижи почетни морталитет фертилних мужјака) био је прилично изненађујући.

Једно могуће објашњење могло би бити то што је при вишој температури, излетање одраслих брже (Waldock et al. (2013), те се стога морталитет лутки смањује. Међутим, треба напоменути да су у нашем експерименту у полу-природним условима температуре вариране, те је понекад MAX дневна  $t$  премашивала 37°C (критична температура за преживљавање лутки по Vagny et al. 2009 и Lee 1994b), што је могло негативно утицати на преживљавање лутки мужјака. Али, пошто сакупљени резултати нису потврдили ове налазе, у циљу обезбеђивања могућег објашњења, требало је размотрити још један додатни аспект. У нашем експерименту су кантице са луткама биле постављене у тунеле близу саме ивице, те су стога, биле подложне утицају могућих падавина. Иако учесталост и количина падавина нису регистроване (мада је током експеримента примећено неколико пљускова), оне су могле променити температуру воде (у кантицама са луткама) односно

утицати на њено расхлађивање (те стога допринети елиминацији повремених негативних утицаја проузрокованих екстремно високим температурама).

У сваком случају, одлучили смо да потражимо доказе који би могли да објасне појаву да је приликом посматрања искључиво периода са значајним разликама у температурама, почетни морталитет фертилних мужјака био у значајној негативној корелацији са просечном МАХ дневном температуром. Након селекције парова података у којима су периодима са две значајно различите температуре (унутар средње дневне  $t$ , просечне МАХ и  $\min$  дневне  $t$  током првих 6 дана) биле придружене вредности почетног морталитета фертилних мужјака регистроване у тим периодима, резултат је био изненађујући. Унутар сваког од испитиваних температурних параметара, број парова у којима је однос почетног морталитета фертилних мужјака и температуре био обрнуто пропорционалан, био је виши него у друге две могуће манифестације односа (пропорционалан, или није у корелацији). Тако је у оквиру посматрања просечне МАХ дневне  $t$ , тај однос био обрнуто пропорционалан у 75% случајева, док је приликом посматрања средње дневне  $t$  и просечне  $\min$  дневне  $t$ , тај однос (у сваком од ова два температурна параметра) био обрнуто пропорционалан у 71% случајева. Занимљиво је да је процентуална расподела преосталих двеју могућности (односно када је однос пропорционалан и када није у корелацији) била једнака унутар сваког од три тестирана температурна параметра, те је код просечне МАХ дневне  $t$  свака од опција била заступљена у 12,5% случајева, док су код средње дневне  $t$  и просечне  $\min$  дневне  $t$  ове опције биле заступљене по 14,28% свака.

Није лако објаснити уочени обрнуто пропорционалан однос, који се манифестовао у високом проценту у свим испитиваним температурним параметрима. Могући узрок овог феномена може бити да варијација температуре у одређеном температурном опсегу може имати значајан утицај на успешност излетања одраслих, те дејствовати као стимулативан или неповољан фактор, у зависности од нивоа и трајања ове варијације, као и њене фреквенције током критичних сати стадијума лутке и/или специфично током часова излетања одраслих. Ова претпоставка је инспирисана резултатима Monteiro et al. (2007), који су пријавили да је стопа пиљења јаја *Ae. albopictus* била значајно виша на температури природног окружења (25-29 °C), него при константним температурама у лабораторији (25, 30 и 35 °C), што указује на то да варијација температуре такође може

бити фактор који стимулише пиљење, поред већ познатог смањења садржаја кисеоника у води (Judson 1963) и фотопериода (Nayar et al. 1973).

Иако је неколико група аутора (Monteiro et al. 2007, Delatte et al. 2009) показало да је константна висока температура (35 °C) изразито негативно утицала на преживљавање јувенилних стадијума *Ae. albopictus*, према нашим сазнањима нема информација о утицају варијације температуре, која укључује краткорочне веома високе или ниске температуре (које се смењују са оптималном температуром), на развој и преживљавање лутки, нити има информација о њиховој могућој корелацији. Овакава врста података би могла бити значајан фактор у предвиђању степена преживљавања лутки и успешности излетања одраслих у природи након отпуштања.

#### **6.2.6. Процент резидуалних женки у узорку и остала питања сепарације полова**

Сепарација полова је једна од критичних тачака SIT апликације, пошто постројења за масовни узгој инсеката иницијално производе једнак број јединки оба пола, а женке морају бити одвојене пре отпуштања.

Методи механичке сепарације полова (као што су техника „просејавања“, или употреба сепаратора са плочама) базиране на полном диморфизму лутки и протандрији, ретко омогућавају обезбеђивање заиста једнополне популације (у најбољем случају у узорку остаје 0,1-1% женки) (Parathanos et al. 2009, Alphey et al. 2010). Осим механичких метода сепарације, развијени су различити системи елиминације женки и генетичког раздвајања полова (Thomas et al. 2000, Parathanos et al. 2009). До данас су овакви GSS (genetic sexing strain) сојеви развијени за 20 врста инсеката (Robinson 2002), али само две од њих (*Anopheles albimanus* и *Ceratitis capitata*) имају сојеве развијене до степена да могу бити масовно узгајани за потребе SIT-а (Franz 2005). У таквим сојевима, женке могу бити елиминисане путем излагања јаја инсектициду (код GSS соја врсте *An. albimanus*, селектована је мутација која је мужјаке учинила резистентним на инсектицид) или високој температури (код GSS соја врсте *C. capitata*, ембриони женки имају креирану леталну мутацију која испољава своје дејство при високој температури тзв. температурно-

сензитивна летална мутација) (Parathanos et al. 2009, Alphey et al. 2010). Другим речима, мужјаци преживљавају излагање оваквим условима, али женке не.

Без обзира на есенцијалну потребу да се створи сој врсте *Ae. albopictus* (заснован на класичним генетичким методима) који ће омогућити једноставно и прецизно раздвајање полова, он још увек није креиран услед строгих захтева које такав сој мора имати (нпр. дугорочна стабилност, поузданост да се у узорку за отпуштање неће наћи женке, добра конкуритивност мужјака при парењу итд.). Осим тога, пошто колонија мора бити одржавана за производњу мужјака, механизам који елиминише женке мора бити услован (неопходно је да се може „укључивати“ и „искључивати“ према потреби) (Parathanos et al. 2009).

Као другачији приступ за раздвајање полова, понуђен је трансгенетички систем, који се заснива на индуковању доминантно леталних мутација као што је већ поменути, RIDL принцип. У питању је, заправо, условна леталност специфична само за женке, што значи да се манифестује само приликом примене одређених услова (одсуство тетрациклина), односно женке умињавају ако им се, током ларвалног развоја, не обезбеди тетрациклин или адекватан хемијски аналог; док се у случају правовременог обезбеђивања овог антидота (потискивача односно репресора), дејство доминантно леталних мутација потискује (Alphey et al. 2010). Овај систем омогућава 100% сепарацију мужјака, неопходну за SIT (при чему би нарочито била погодна категорија ране елиминације женки с обзиром да би се тако могли значајно снизити трошкови масовног узгоја). Поред тога, трансгенетички систем се такође може користити у програмима сузбијања, без потребе за стерилизацијом путем ирадијације (озрачивања) (Thomas et al. 2000, Alphey et al. 2010, Gentile et al. 2015). Међутим, упрокс томе, последња група аутора је истакла и упозорила да мушко потомство таквих отпуштених мужјака (током наредних неколико генерација), такође може служити и као резервоар за настајање дивљег типа комараца (пошто се проценат леталних трансгена смањује у свакој наредној генерацији), те би, стога, трансгене мужјаке ипак било боље подрвгнути ирадијацији пре отпуштања у природу.

Када је у питању примена оваквог трансгенетичког система на *Ae. albopictus*, до сада је за ову врсту креиран фенотипски сој женки које не могу да лете (*Ae. albopictus* OX3688), осим ако током ларвалног узгоја нису добиле антидот. Такав сој је креиран путем изолације специфичног гена, који служи за пренос доминантног инхибиторног гена у

индиректне мишиће лета женки, што индукује појаву фенотипа који не може да лети. Овај фенотип би се могао користити и за раздвајање полова (иако то не би било економски исплативо у погледу смањења трошкова масовног узгоја), и за сузбијање *Ae. albopictus* (Labbé et al. 2012).

У сваком случају, пошто у многим земљама отпуштање генетски модификованих инсеката није прихватљиво, а и пошто њихова употреба отвора многа питања везана за утицај на природу, најбољу тренутну могућност за раздвајање полова *Ae. albopictus*, још увек представљају методи који се ослањају на биолошке и/или морфолошке разлике мужјака и женки (Parathanos et al. 2009).

Подаци о проценту резидуалних женки у узорку „просејаних“ лутки могли би бити важни у случају примене SIT-а у природи у подручјима ендемским за одређене патогене и неопходни су за оцену квалитета соја планираног за отпуштање. Да би се одредило који од три соја које смо користили има најбоље особине за SIT апликацију, израчуната је и вероватноћа појаве женки у „просејаном“ узорку за сваки од сојева. Она је била најмања код LAB соја RER (F8, F9) ( $\pi = 0,017$ , што је утврђено на основу регистрованих  $1,44 \pm 0,41\%$  „просејаних“ женки), праћена WILD сојем Crevalcore (F0) ( $\pi = 0,029$ ;  $2,13 \pm 1,11\%$ ), док је LAB сој Rimini (F52, F53, F54) испољио највећу вероватноћу за појаву женки ( $\pi = 0,044$ ;  $4,43 \pm 1,60\%$ ). Bellini et al. (2013a) су током извођења трогодишњих SIT огледа у природи, који су се односили на супресију врсте *Ae. albopictus* у северној Италији, забележили просечно присуство од  $1,21 \pm 1,22\%$  резидуалних женки у „просејаном“ узорку укупног броја отпуштених лутки, што је у складу са нашим резултатима уоченим за LAB сој RER. Balestrino et al. (2014b) су такође демонстрирали учинак технике „просејавања“ при сепарацији полова *Ae. albopictus* (тестирајући исти сој при различитим условима гајења) и приказали серију резултата који се односе на проценат мужјака који су прошли кроз сито, чија се вредност кретала у опсегу од  $96,50 \pm 0,88$  до  $99,18 \pm 0,34\%$  (што одговара присуству  $3,5\%$  до  $0,82\%$  резидуалних женки у „просејаном“ узорку).

У сваком случају, различите вероватноће појаве женки у „просејаном“ узорку, утврђене у нашем експерименту за сваки од три коришћена соја (који су гајени у истим условима), могу бити објашњене временом развоја (које се односи на моменат почетка улуткавања

мужјака и женки) које се може благо разликовати између сојева, те стога утицати на различит број лутки женки присутних у колонији у тренутку „просејавања“, те последично и на њихов пролазак кроз сито. Оваква врста информације је драгоцену, тако да се препоручује одређивање овог времена развоја пре примене SIT-а, не би ли се одабрао сој који има што удаљеније почетке улуткавања мужјака и женки. Ово може помоћи у смањењу процента резидуалних женки у „просејаном“ узорку, што је од изузетне важности у подручјима где су патогени које преноси *Ae. albopictus* ендемски, тако да отпуштање њихових потенцијалних вектора не би било прихватљиво (Zhang et al. 2015). Осим тога, у случају примене технике некомпатибилности инсеката (Incompatible Insect Technique - ИТ), случајно отпуштање женки трансинфицираних различитим (односно некомпатибилним) сојем *Wolbachia*-е (у оквиру планираног отпуштања некомпатибилних мужјака), може резултовати заменом циљне дивље популације (јединкама које имају „нови“ сој *Wolbachia*-е), уместо њене супресије (IAEA 2013).

Поврх тога, приликом примене SIT-а, случајно отпуштање женки (иако би оне свакако биле подвргнуте ирадијацији и стерилисане) генерално може смањити ефикасност супресије циљне популације (Zhang et al. 2015), пошто такве женке могу утицати на „преусмеравање“ активности стерилних мужјака и одвратити их од парења са дивљим женкама (Bellini et al. 2013a). Смањење процента резидуалних женки у узорку, један је од највећих изазова у SIT-у, нарочито када су у питању огледи великих размера, у којима се отпушта на стотине хиљада или чак милиони стерилних мужјака комараца.

Надаље, ако се за раздвајање полова изабере техника „просејавања“, поред могуће појаве женки у „просејаном“ узорку, евидентна је још једна мана, која се манифестује кроз ниску бројност „просејаних“ мужјака, која код врсте *Ae. albopictus* обично чини свега 20-29% од укупног броја произведених мужјака (IAEA 2014a, Bellini et al. 2013a), што заправо представља 10-14,5% јединки од укупног почетног броја ларви првог ступња, узимајући у обзир однос мужјака и женки 1:1 (Bellini et al. 2013a). Ове чињенице доприносе порасту трошкова SIT-а, јер да би се обезбедио довољан број мужјака који ће бити стерилисани и отпуштени, мора се масовно узгајити много већи број инсеката, у случају да се за раздвајање полова комараца одабере техника „просејавања“.

Насупрот томе, један од најсавременијих начина ефикаснијег система раздвајања полова, који може омогућити 100% сепарацију мужјака и значајно редуковати трошкове масовног узгоја, је RIDL систем. Међутим, он такође има извесне недостатке. Интродуковање било каквог трансгена у популацију комараца може проузроковати велико смањење виталности отпуштених мужјака те услед тога негативно утицати на њихову конкурентност у односу на дивље мужјаке (Alphey et al. 2013, Bargielowski et al. 2012, Hoang et al. 2016). Стога би овакав систем изискивао повећање односа отпуштања (броја отпуштених стерилних мужјака у односу на дивље), као и учесталости отпуштања, што би последично водило повећању оперативних трошкова. С друге стране, трошкови програма сузбијања би могли бити редуковани производњом популација комараца коју чине само мужјаци, како би се избегло одстрањивање женки пре отпуштања, а без смањења конкурентности мужјака узрокованог трансгенима која је уочена у претходним студијама (Hoang et al. 2016). Ова група аутора је већ започела креирање и истраживање овакве врсте посебне трансгенетичке линије на *Ae. aegypti* (*Ae. aegypti* tra-2 RNAi), и прелиминарна тестирања су у току.

Међутим, постоје тек веома оскудне информације о томе како би генетички модификовани организми и системи испољавања гена (потребни за стварање самоодрживих система) могли утицати на животну средину и какве би се могуће негативне еволутивне последице могле догодити; нарочито због недостатка контроле над оваквим организмима након што буду отпуштени у природу (Alphey et al. 2013, David et al. 2013). Осим тога, да би се у одређеној држави могли отпустити генетички модификовани комарци (GMM), неопходно је прибавити специјалне дозволе и одобрења од владе (што је отежавајућа околност), те је, стога експериментална употреба генетички модификованих комараца још увек ограничена на веома мали број земаља.

#### **6.2.7. Потребна будућа истраживања и предлог стратегије за поједностављење процедура процене квалитета мужјака и његовог мониторинга током сезоне**

Због свих претходно наведених чињеница о могућим негативним еволутивним последицама у случају примене GMM, још увек је веома важно радити на побољшању и

развоју механичког начина раздвајања полова врсте *Ae. albopictus*, који искључује отпуштање генетички модификованих (трансгенетичких) организама. Као што је сугерисано од стране Bellini et al. (2013a), ово би могло подразумевати селекционисање соја који би имао израженију протандију. Једна могућност била би укрштање мужјака сакупљених на самом почетку улуткавања са женкама сакупљеним последњег дана улуткавања, како би се произвео сој код кога не само да би протандрија била наглашенија, него би и продукција мужјака била повећана, а контаминација узорка женкама редукована. Селекција оваквог соја са удаљенијим почецима улуткавања мужјака и женки (које искључује њихова преклапања током првих 20-24 часа) била би од огромног значаја за побољшање сепарације мужјака и могла би се користити у SIT апликацији без икаквих бојазни, које се неминовно јављају када се дође на идеју отпуштања генетски модификованих организама.

Осим рада на развоју технике раздвајања полова, такође би требало спровести још истраживања за боље разумевање могућих модификација неопходних за: а) побољшање осетљивости презентованог SIT метода у полу-природним условима, и б) следљивости добијених резултата (у студијама компетитивности у великим кавезима), као што је већ примећено од стране Bellini et al. (2013b). Ови аутори истичу и сугеришу да приликом свих модификација приоритет треба да буде обезбеђивање услова који максимално симулирају ситуацију у природи, укључујући дефинисање најбоље величине кавеза, као и специфичне захтеве различитих врста комараца.

С обзиром на то да су овакви тестови радно интензивни и дуготрајни, као и тешко упоредиви међу различитим студијама (услед коришћења различитих метода); било би практично успоставити јединствени међународни протокол за испитивање компетитивности *Ae. albopictus* у полу-природним условима, кога би чиниле најбоље препоруке за извођење такве студије.

Након валидације стандардизованог протокола, оглед за оцену компетитивности стерилисаних мужјака у полу-природним условима би се могао изводити у циљу одређивања нивоа корелације одређених тестираних квалитативних параметара у тунелима са адекватним и комплементарним лабораторијским тестирањем. Предлажемо да ови специфични лабораторијски тестови укључе употребу иновација приказаних у Balestrino et al. (2017). Ова група аутора је конструисала специјалне направе (уређај за



летење и уређај за аспирирање) које могу бити коришћене за поређење капацитета лета (под ограниченим условима и након стресног третмана) и параметара квалитета стерилисаних масовно узгојених мужјака LAB соја и нетретираних мужјака WILD соја. Њихове иновације су биле инспирисане чињеницом да капацитет лета представља један од најдиректнијих и најпоузданијих показатеља квалитета инсеката (FAO/IAEA/USDA 2014, Benedict et al. 2009, Carpenter et al. 2012, Seck et al. 2015). Осим тога, помоћу препорученог уређаја за оцену капацитета лета такође се могу регистровати стопа излетања одраслих и однос полова у узорку лутки, што су два изузетно важна параметра оцене квалитета мужјака и ефикасности метода раздвајања полова (Calkins and Parker 2005, Balestrino et al. 2017). Поменути уређаји које су направили Balestrino et al. (2017) могли би омогућити идентификацију било које неадекватне процедуре у процесу масовног узгоја и проценити појединачни и кумулативни стрес током производне линије мужјака (који могу утицати на коначни квалитет мужјака и њихов учинак у природи), те на тај начин осигурати да свака потребна корекција буде благовремено спроведена.

Предложени протокол, који би подразумевао комбинацију једнократног извођења огледа конкуритивности у полу-природним условима и вишеструких извођења лабораторијских тестова (по сезони SIT апликације), као начина поуздане процене квалитета мужјака и његовог мониторинга током сезоне, био би једноставнији и ефикаснији, као и финансијски исплативији, у поређењу са тренутном методологијом контроле квалитета у SIT програму.

## 7. ЗАКЉУЧЦИ

Први део студије истиче реакцију природне популације *Aedes albopictus* на колонизациони притисак и утицај величине кавеза на селекцију одређених показатеља виталности ове врсте комарца (дужине крила, преживљавања и продукције јаја).

Најмањи кавез (C1) не само да је демонстрирао највише вредности свих испитиваних параметара, него и њихово најмање опадање током првог потпериода. Опоравак популације комараца у другом потпериоду је био знатно бољи у најмањем и средњем кавезу (C2), него у највећем (C3). Осим тога, веће димензије и већа тежина, чине C3 не баш најпогоднијим избором за практичну употребу. У кавезу C3 су дужина крила и преживљавање адулта (оба пола) били значајно нижи него у C1, а продукција јаја није испољила опоравак у другом потпериоду (који је био типичан за кавезе C1 и C2). Са друге стране, иако су комарци из C2 имали најкраћа крила, преживљавање адулта и продукција јаја нису показали значајне разлике у поређењу са C1.

Све поменуто нас води уверењу да гајење комараца у кавезу C1 обезбеђује најмањи негативан утицај на оригиналне карактеристике популације комараца. Једино би, услед коцкастог облика C1 кавеза, у условима ограниченог простора (при масовном узгоју комараца) кавез C2 могао бити бољи избор. Кавез C2 има погоднији облик (усправни квадар) и већу запремину од C1, што је практичније и економичније у гајењу великог броја комараца потребних у SIT програму.

Други део студије односно оцена компетитивности стерилних мужјака *Aedes albopictus*, обезбедила нам је веома вредне информације о квалитету мужјака трију испитиваних сојева, путем посматрања и тестирања најважнијих аспеката понашања, учинка при парењу и осталих карактеристика стерилних и фертилних мужјака.

Одређивање компетитивности при парењу стерилних мужјака, показало је обећавајуће резултате, пошто се ни у једној од четири тестиране комбинације сојева нису испољиле значајне разлике у посматраним параметрима (број јаја/тунелу; број јаја/женки; стопа фертилитета јаја; CIS Index; Fried Index). Забележени резидуални фертилитет мужјака (у просеку: 2,82 % при дози озрачивања од 30 Gy), као и уочене вредности CIS и Fried индекса (у просеку око 1), били су веома задовољавајући, указујући на то да су стерилни и фертилни мужјаци били приближно једнако компетитивни, и да је доза ирадијације од 30 Gy била веома добар избор за индукцију стерилитета у циљну популацију (у смислу оптимизације баланса између виталности мужјака и нивоа стерилитета). Пошто је варијабилност резултата била прилично изражена, препоручује се извођење већег броја понављања у будућности, како би се утврдило да ли је нека од четири тестиране комбинације учинковитија.

Да би се обезбедило више информација о квалитету сваког од коришћених сојева, додатно је праћено још неколико важних индикатора квалитета: почетни морталитет мужјака, дневна стопа преживљавања, као и њене корелације са метеоролошким факторима, корелације почетног морталитета фертилних мужјака са температурним параметрима, и проценат резидуалних женки у „просејаном“ узорку. Када је у питању примена SIT-а у природи, оцена ових параметара у складу са коришћеним сојем, је од високог значаја, јер су ти подаци неопходни за процењивање броја стерилних мужјака које треба отпустити и детерминацију учесталости отпуштања, да би се постигла супресија дивље популације.

У третману су мужјаци LAB соја (Rimini) испољили значајно виши почетни морталитет од мужјака WILD соја (Crevalcore), који је био израженији код стерилних, него код фертилних мужјака. Унутар истог соја нису уочене значајне разлике у почетном морталитету стерилних и фертилних мужјака, што указује на то да ирадијација од 30 Gy није изазвала штетан ефекат.

Осим тога, када је засебно проучаван почетни морталитет фертилних мужјака сва три коришћена соја (тј. укуључујући и LAB сој RER, коришћен у контроли), показало се да је WILD сој био значајно отпорнији на неконтролисане екстерне факторе. Ово је вероватно повезано са процесом колонизације LAB соја и бројем генерација у „заточеништву“, што је довело до смањење отпорности на стресне услове.

Дневне стопе преживљавања (SR) оба пола и тестираних сојева/комбинација сојева, биле су сличне и у сагласности са ранијим студијама о *Ae. albopictus*-у у полу-природним условима. Приликом испитивања могућих корелација SR и различитих метеоролошких фактора, статистичка значајност је констатована само у случају женки WILD соја. Ово може бити објашњено чињеницом да WILD сој није био подвргнут колонизацији, те је био боље прилагођен променљивим условима животне средине.

Вероватноћа појаве женки у „просејаном“ узорку сваког од испитиваних сојева, била је најнижа код LAB соја (RER), што може бити објашњено удаљенијим почецима улуткавања мужјака и женки овог соја, у поређењу са WILD и LAB (Rimini) сојевима.

Сви тестирани параметри су показали веома добре карактеристике свих трију сојева. Иако је LAB сој (Rimini) показао мању отпорност на различите штетне екстерне факторе, мужјаци овог соја су показали веома добру конкуритивност у третману. Дневне стопе преживљавања мужјака и женки свих сојева/комбинација сојева биле су сличне. Све ове чињенице указују на то да би LAB сој (Rimini) могао бити погодан за примену SIT-а у природи, с обзиром да се може лако масовно производити и да већ поседује извесну стабилност постигнуту кроз процес колонизације, у поређењу са WILD сојем. Међутим, с обзиром да је број резидуалних женки у „просејаном“ узорку Rimini соја био прилично висок и знајући да то представља један од круцијалних параметара за отпуштање у природу, препоручујемо да се у будућим применама SIT-а у природи користи други испитивани LAB сој (RER), који има најмању вероватноћу појаве женки у узорку.

Осим тога, с обзиром да између посматраних температура ваздуха и почетног морталитета фертилних мужјака нису констатоване значајне корелације, извели смо додатно тестирање, при чему је уочена изненађујућа појава. Приликом испитивања парова података које су чинили периоди са значајно различитим температурама (средње дневне  $t$ , просечне MAX и min дневне  $t$ ) утврђено је да је почетни морталитет најчешће био у обрнуто пропорционалној вези са температуром. Ово указује на то да варијација температуре (појава периода краткотрајних високих или ниских температура) у одређеном опсегу и фреквенцији, може стимулативно или инхибиторно утицати на процес излетања одраслих. Фокусирање испитивање овог специфичног аспекта могло би обезбедити значајне податке у вези са предвиђањем преживљавања лутки и успешности излетања одраслих *Ae. albopictus* у природи, након отпуштања.

Да би различите студије компетитивности стерилних мужјака у полу-природним условима могле бити упоредиве, као и да би се побољшала осетљивост овог метода, било би практично успоставити међународни протокол за испитивање компетитивности *Ae. albopictus* у полу-природним условима.

Јединствени проткол који предлагемо треба да укључи (осим протокола за масовни узгој и сепарацију полова): а) методе одређивања најбоље дозе ирадијације; б) дефинисану старост лутки у моменту стерилизације; ц) препоручене односе стерилних мужјака:фертилних мужјака: женки по кавезу, као и њиховог броја (предлажемо повећање броја женки у циљу добијања већег броја јаја); д) методе за хармонизацију старости мужјака и женки у моменту њихове интродукције у кавезе; е) процедуре за стандардизовање крвног оброка (одређивање домаћина, најпогоднијег тренутка за исхрану и његовог прилагођавања локалним температурама); ф) процедуру за додатну исхрану комараца растворима шећера; г) дефинисање облика и димензија великих кавеза постављених у природу.

Осим тога, могуће увођење великих кавеза округлог облика, који би на пример имали пречник 8 m (уместо досадашњих у облику тунела), могло би обезбедити уједначеније услове унутар кавеза (нарочито када је у питању хладовина), што је много практичније за овакву врсту експериментата, те би њихове перформансе требало упоредити са тунелима пре конципирања протокола. У сваком случају, након што се једном прихвати, јединствени протокол би допуштао само минималне адаптације у складу са локалним условима (нпр. по питању избора соја који би требало користити, или неких других значајних локалних фактора које би требало узети у обзир).

Поред тога, без обзира на имплементацију већ поменутих иновативних, брзих и финансијски исплативих уређаја за упоређивање капацитета летења мужјака и параметара квалитета, који служе за идентификовање пропуста у процесу масовног узгоја; подаци добијени у експерименту у полу-природним условима, ће и даље бити основни и најпоузданији метод за процену квалитета стерилних мужјака и њихове компетитивности, пошто се у таквом виду истраживања симулирају услови који су најближи природним. Стога би сваки будући експеримент за унапређења протокола *Ae. albopictus* SIT у полу-

природним условима, био од изузетне важности у борби против ове врсте комараца и патогена које она може пренети.

Поврх тога, услед повећаног ризика од ширења *Ae. albopictus*-а у Србији (његово присуство је још увек ограничено на граничне прелазе са Хрватском и Црном Гором) и могуће интродукције патогена које преноси, неопходна је интеграција свих расположивих средстава контроле вектора (физичких, биолошких, хемијских и генетичких) за правовремени одговор на могуће инвазије и епидемије. За имплементацију SIT-а у Србији, обучен и високо квалификован локални кадар (припремљен да правилно изведе сваки поједини корак током SIT апликације) био би од круцијалног значаја, пошто би то могло умногоме редуковати трошкове целокупне процедуре, услед смањене потребе за ангажовањем страних експерата и/или скраћења њиховог боравка у Србији. Додатни бенефит ове докторске дисертације је драгоцено и неопходно знање и практично искуство за примену SIT –а које је ауторка стекла током израде своје дисертације и поделила га са колегама и студентима у Србији.

## 8. ЛІТЕРАТУРА

1. **Ageep, T.B., D. Damiens, B. Alsharif, A. Ahmed, E.H.O. Salih, F.T.A. Ahmed, A. Diabate, R.S. Lees, J.R.L. Gilles, B.B. El-Sayed. 2014.** Participation of irradiated *Anopheles arabiensis* males in swarms following field release in Sudan. *Malaria Journal*. 13: 484
2. **Aida, HN, Dieng H, Ahmad AH, Satho T, Nurita AT, Salmah RC, et al. 2011.** The biology and demographic parameters of *Aedes albopictus* in northern peninsular Malaysia. *Asian Pac J Trop Biomed*.:472–7.
3. **Albieri, A., M. Carrieri, P. Angelini, F. Baldacchini, C. Venturelli, S. Mascali Zeo, R. Bellini. 2010.** Quantitative monitoring of *Aedes albopictus* in Emilia-Romagna, Northern Italy: cluster investigation and geostatistical analysis. *Bull. Insectol*. 63: 209-216.
4. **Ali, S. H., and Hozenboom. L. E. 1972.** Observation on sterilization of *Anopheles (C.) albimanus* Wiedemann by Xirradiation. *Mosq. News* 32: 574-579.
5. **Alphey, L., D. Nimmo, S. O’Connell, N. Alphey. 2007.** Insect population suppression using engineered insects. In: Aksoy, S, ed. *Transgenesis and the Management of Vector-Borne Disease*. Austin, TX: Landes Bioscience 93–103.
6. **Alphey, L., M. Benedict, R. Bellini, G.G. Clark, D.A. Dame, M.W. Service, S.L. Dobson. 2010.** Sterile insect methods for control of mosquito-borne diseases: An analysis. *Vector-Borne Zoonot Dis* 10: 295–311.
7. **Alphey, L., A. McKemey, D. Nimmo, M.N. Oviedo, R. Lacroix, K. Matzen, C. Beech. 2013.** Genetic control of *Aedes* mosquitoes. *Pathol. Glob. Health*. 107(4): 170-179.
8. **Alto, B.W. and Juliano, S. A. 2001.** Precipitation and Temperature Effects on Populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): Implications for Range Expansion. *J Med Entomol*. 2001 September; 38(5): 646–656.
9. **Andreasen, M.H. and C.F. Curtis. 2005.** Optimal life stage for radiation sterilization of *Anopheles* males and their fitness for release. *Med. Vet. Entomol*. 19, 238–244.
10. **Anonymous 2015:** <http://fmel.ifas.ufl.edu/research/molecular.shtml>
11. **Anonymous 2018:** <http://www.oxitec.com/our-solution/technology/how-it-works>

12. **Ansari, M, Singh, K, Brooks, G, Malhotra, P and Vaidyanathan, 1977.** The development of procedures and techniques for mass rearing of *Aedes aegypti*. The Indian Journal of Medical Research 65: (Suppl) 91-9.
13. **Anwar, M, Chambers DL, Ohinata K, Kobayashi RM. 1971.** Radiation-sterilization of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): Comparison of spermatogenesis in flies treated as pupae or adults. Ann Entomol Soc Am, 64:627-633.
14. **Asman, S.M., R.L. Nelson, P.T. McDonald, M.M. Milby, W.C. Reeves, K.D. White, P.E.M. Fine. 1979.** Pilot release of a sex-linked multiple translocation into a *Culex tarsalis* field population in Kern County, California. Mosq. Systematics 39, 248–258.
15. **Asman, S.M., P.T. McDonald, T. Prout. 1981.** Field studies of genetic control systems for mosquitoes. Annu Rev Entomol, 26:289-318.
16. **Asman, S.M., P.T. McDonald, W.K. Reisen, M.M. Milby, W.C. Reeves. 1983.** A field release of radio-sterilized males to suppress an isolated population of *Culex tarsalis*. April 18–22 1982; Sacramento, California, USA. CMVCA Press, Sacramento, California, USA.
17. **Ayres, C.F.J., T.P.A. Romao, M.A.V. Melo-Santos, and A.F. Furtado. 2002.** Genetic diversity in Brazilian populations of *Aedes albopictus*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 97(6): 871-875.
18. **Bagny, L., Delatte, H., Elissa, N., Quilici, S., Fontenille, D. 2009.** *Aedes* (Diptera: Culicidae) vectors of arboviruses in Mayotte (Indian Ocean): distribution area and larval habitats. J Med Entomol. 2009;46(2):198–207
19. **Baker, R.H., W.K. Reisen, R.K. Sakai, C.G. Hayes, M. Aslamkhan, U.T. Saifuddin, F. Mahmood, A. Perveen, S. Javed. 1979.** Field assessment of mating competitiveness of male *Culex tritaeniorhynchus* carrying a complex chromosomal aberration. Ann Entomol Soc Am 72: 751–758.
20. **Bakri, A, Mehta K, Lance DR. 2005.** Sterilizing insects with ionizing radiation. In Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management Edited by: Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS. 2005. Dordrecht: Springer, 233-268.
21. **Balestrino, F., A. Medici, G. Candini, M. Carrieri, B. Maccagnani, M. Calvitti, S. Maini, and R. Bellini. 2010.** Y ray dosimetry and mating capacity studies in the laboratory on *Aedes albopictus* males. J. Med. Entomol. 47: 581-591
22. **Balestrino, F., A. Puggioli, R. Bellini, D. Petrić, and J.R.L. Gilles. 2014a.** Mass Production Cage for *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 51(1): 155-163
23. **Balestrino, F., Puggioli, A., Gilles, J.R.L., Bellini, R., 2014b.** Validation of a new larval rearing unit for *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) mass rearing. PLoS One 9,e91914.
24. **Basuki, T.A., Cerone A., Barbuti R., Maggiolo-Schettini A., Milazzo P., Rossi E. 2010.** Modelling the dynamics of an *Aedes albopictus* population. In: Milazzo P, Perez Jimenez MJ,



- editors. Applications of membrane computing, concurrency and agent-based modelling in population biology.p. 18–36.
25. **Barclay, H. J. 1996.** Combining methods of insect pest control: modelling selection for resistance to control methods in combination. *Researches on Population Ecology* 38: 75–85.
  26. **Barclay, H. J. 2005.** Mathematical models for the use of sterile insects. *In* V. A. Dyck, J. Hendrichs and A. S. Robinson (eds.), *Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. Springer, Dordrecht, Netherlands, pp. 147–174.
  27. **Barclay, H.J., W. Enkelin, N.Manoukis, J. Reyes-Flores. 2013.** Guidelines for the use of mathematics in operational area-wide integrated pest management programs using the sterile insect technique with a special focus on Tephritid Fruit Flies. Vienna: IAEA Publications. 102 p.
  28. **Bargielowski, I., Kaufmann C., Alphey L., Reiter P., Koella J. 2012.** Flight performance and teneral energy reserves of two genetically-modified and one wild-type strain of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Vector Borne Zoonotic Diseases*;12:1053–8.
  29. **Bartlett, A.C. 1984.** Genetic changes during insect domestication. *In*: King, E.G., and N.C. Leppla (eds.), *Advances and Challenges in insect rearing*. USDA/ARS, New Orleans, pp. 2-8
  30. **Bat-Miriam, M., and G. B. Craig, Jr. 1966.** Mutants in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Mosquito News* 26(1): 13-22.
  31. **Baumhover, A. H., A. J. Graham, B. A. Bitter, D. E. Hopkins, W. D. New, F. H. Dudley, and R. C. Bushland. 1955.** Screwworm control through release of sterilized flies. *Journal of Economic Entomology* 48: 462–466. *In*: Dyck, VA, Hendrichs, J, Robinson, AS, eds. 2005. *Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. Dordrecht, The Netherlands: Springer
  32. **Bloem, K.A., and S. Bloem. 2000.** SIT for codling moth eradication in British Columbia, Canada. *In*: Tan, K.H. (Ed.), *Area-Wide Control of Fruit Flies and other Insect Pests*. Joint Proceedings of the International Conference on Area-Wide Control of Insect Pests, May 28 June 2, 1998 and the Fifth International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, June 1-5, 2008, Penang, Malaysia, Penang, pp. 207–214.
  33. **Becker, N., D. Petrić, M. Zgomba, C. Boase, M. Madon, C. Dahl, A. Kaiser. 2010.** *Mosquitoes and Their control*. Springer Heidelberg 2<sup>nd</sup> edition.
  34. **Bellini, R., M. Calvitti, A. Medici, M. Carrieri, G. Celli, and S. Maini. 2007.** Use of the sterile insect technique against *Aedes albopictus* in Italy: first results of a pilot trial, pp. 505–515. *In* M.J.B. Vreysen, A. S. Robinson, and J. Hendrichs (eds.), *Area-wide control of insect pests: from research to field implementation*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

35. **Bellini, R., A. Albieri, F. Balestrino, M. Carrieri, D. Porretta, S. Urbanelli, M. Calvitti, R. Moretti, and S. Maini. 2010.** Dispersal and survival of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) males in Italian urban areas and significance for sterile insect technique application. *J. Med. Entomol.* 47(6): 1082-1091. doi: 10.1603/ME09154.
36. **Bellini, R., A. Medici, A. Puggioli, F. Balestrino, and M. Carrieri. 2013a.** Pilot field trials with *Aedes albopictus* irradiated sterile males in Italian urban areas. *J. Med. Entomol.* 50(2): 317-325.
37. **Bellini, R., F. Balestrino, A. Medici, G. Gentile, R. Veronesi, M. Carieri. 2013b.** Mating competitiveness of *Aedes albopictus* radio-sterilizes males in Large enclosures to natural conditions. *J. Med. Entomol.* 50(1): 94-102
38. **Bellini, R., A. Puggioli, F. Balestrino, P. Brunelli, A. Medici, S. Urbanelli, M. Carrieri. 2014.** Sugar administration to newly emerged *Aedes albopictus* males increases their survival probability and mating performance. *Acta Tropica* 132S: S116—S132.
39. **Benedict, M. Q., A. Robinson. 2003.** The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. *Trends Parasitol.* 19: 349-355.
40. **Benedict, M. Q., R. S. Levine, W. A. Hawley, L. P. Lounibos. 2007.** Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vector-Borne Zoonot.* 7: 76–85.
41. **Benedict, M. Q., B. G. J. Knols, H. C. Bossin, P. I. Howell, E. Mialhe, C. Caceres, A. S. Robinson. 2009.** Colonisation and mass rearing: learning from others. *Malar. J.* 8 (Suppl. 2): S4.
42. **Benelli, G. 2014.** The best time to have sex: mating behaviour and effect of daylight time on male sexual competitiveness in Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae).
43. **Bian, G., Y. Xu, P. Lu, Y. Xie, Z. Xi. 2010.** The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog* 6: e1000833
44. **Blackmore, M.S., and C.C. Lord. 2000.** The relationship between size and fecundity in *Aedes albopictus*. *J. Vector Ecol.* 25(2): 212-217.
45. **Boller, E., and U. Remund. 1983.** Field Feasibility Study for the Application of SIT in *Rhagoletis cerasi* L. in Northwest Switzerland (1976-1979). In *Fruit Flies of Economic Importance*; Cavalloro, R.,Ed.; Balkema: Rotterdam, The Netherlands, 1983; pp. 366-370.
46. **Bonnet, D.D., and D.J. Worcester. 1946.** The dispersal of *Aedes albopictus* in the territory of Hawaii. *The American Journal of Tropical Medicine* 26: 465-476.
47. **Bonizzoni, M., G. Gasperi, X. Chen, A.A. James. 2013.** The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives. *Trends Parasitol* 29(9):460-468.
48. **Boyer, S. J. Gilles, D. Merancienne, G. Lemperiere, D. Fontenille. 2011.** Sexual performance of male mosquito *Aedes albopictus*. *Medical and Veterinary Entomology. The Royal Entomological Society.* (25) 4: 454–459

49. **Boyer, S., C. Toty, M. Jacquet, G. Lemeriere, D. Fontenille. 2012.** Evidence of multiple insemination in the field in *Aedes albopictus*. PloS ONE 7(8): e42040.
50. **Brady, O. J., M. A Johansson, C. A. Guerra, S. Bhatt, N. Golding, D.M. Pigott, H.Delatte, M.G. Grech, P. T. Leisnham, R.I Maciel-de-Freitas, L. M. Styer, D. L. Smith, T. W. Scott, P. W. Gething and S. I. Hay. 2013.** Modelling adult *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* survival at different temperatures in laboratory and field settings. Parasites & Vectors, 6:351
51. **Brayant, E.H., S.A. Mc Commas, L.M. Combs 1986.** The effect of an experimental bottleneck upon quantitative genetic variation in the housefly. Genetics 114(4): 1191-1211.
52. **Brayant, E.H., V.L. Backus, M.E. Clark, and D.H. Reed. 1999.** Experimental tests of captive breeding for endangered species. Conserv. Biol. 13: 1487-1496.
53. **Brelsfoard, C., and S. Dobson. 2011a.** Short note: An update on the utility of *Wolbachia* for controlling insect vectors and disease transmission. AsPac. J. Mol. Biol. Biotechnol. 19(3): 85-92
54. **Brelsfoard, C.L., and S.L. Dobson. 2011b.** *Wolbachia* effects on host fitness and the influence of male aging on cytoplasmic incompatibility in *Aedes polynesiensis* (Diptera: Culicidae). J Med Ent 48: 1008–1015.
55. **Briegel, H., and Kaiser, C., 1973.** Lifespan of mosquitoes (Culicidae: Dipetera) under laboratory conditions. Gerontologia 19, 240–249.
56. **Briegel, H., I. Knüsel, S.E. Timmermann 2001** *Aedes aegypti*: size, reserves, survival, and flight potential. *Journal of Vector Ecology* 26(1): 21-31
57. **Briegel, H, and Timmermann S.E. 2001.** *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): physiological aspects of development and reproduction. J Med Entomol. 2001;38(4):566–71.
58. **Brownstein, J.S., E. Hett, S.L. O’Neill. 2003.** The potential of virulent *Wolbachia* to modulate disease transmission by insects. J. Invertebr. Pathol. 84(1):24-29.
59. **Bushland, R. C. 1960.** Male sterilization for the control of insects, pp. 1–25. In R. L. Metcalf (ed.), Advances in pest control research, volume III. Interscience Publishers, New York, NY, USA. In: Dyck, VA, Hendrichs, J, Robinson, AS, eds. 2005. Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management. Dordrecht, The Netherlands: Springer
60. **CAA - Centro Agricoltura Ambiente,,Giogio Nicoli“. 2011.** Instructions to measure mosquito wings with software ImageJ. CAA - internal document: IOP-EMV-024 REV.00, Crevalcore, Italy.
61. **Calado, D.C., and Silva M.A. 2002.** Avaliacao da influencia da temperatura sobre o desenvolvimento de *Aedes albopictus* [Evaluation of the temperature influence on the development of *Aedes albopictus*]. Rev Saude Publica.;36(2):173–9 (in Portuguese).
62. **Calkins, C. O. 1989.** Lekking behaviour in fruit flies and its implications for quality assessments, pp. 135–139. In R. Cavalloro (ed.), Proceedings, Symposium: Fruit Flies of Economic Importance

87. CEC/IOBC International Symposium, 7–10 April 1987, Rome, Italy. Commission of the European Communities. A. A. Balkema, Rotterdam, The Netherlands.
63. **Calkins, C.O., and Parker A.G. 2005** Sterile insect quality. In: Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS, editors. Sterile insect technique. Principles and practice in area-wide integrated pest management. The Netherlands: Springer; 2005. pp. 269-296.
64. **Calvitti, M., R. Moretti, E. Lampazzi, R. Bellini, S.L. Dobson. 2010.** Characterization of a new *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)-*Wolbachia pipientis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) symbiotic association generated by artificial transfer of the wPip strain from *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol 47: 179–187
65. **Calvitti, M. 2011.** Bacteria endosymbionts: a source of innovation in biotechnology for the control of vector-borne diseases. Review and Assessment papers. Energia, Ambiente e Innovazione 6: 49-57
66. **Cane, R. 2007.** SMS-NZB Southern Monitoring Services – New Zealand Biosecure. Entomology Laboratory. *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse)
67. **Carpenter, J.E., Blomefield T., Vreysen M.J.B. 2012.** A flight cylinder bioassay as a simple, effective quality control test for *Cydia pomonella*. J Appl Entomol. 136(9):711±720.
68. **Carrieri, M., P. Angelini, C. Venturelli, B. Maccagnani, R. Bellini. 2011a.** *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) population size survey in the 2007 Chikungunya outbreak area in Italy. I. Characterization of breeding sites and evaluation of sampling methodologies. J. Med. Entomol. 48: 1214-1225.
69. **Carrieri, M., A. Albieri, P. Angelini, F. Baldacchini, C. Venturelli, S. Mascali Zeo, R. Bellini. 2011b.** Surveillance of Chikungunya vector *Aedes albopictus* (Skuse) in Emilia-Romagna (Italy): organizational and technical aspects of a large scale monitoring system. J. Vector Ecol.36: 108-116.
70. **Carvalho, D.O., D. Nimmo, N. Naish, A. R. McKemey, P. Gray, A. B. B. Wilke, M. T. Marrelli, J. F. Virginio, L. Alphey, and M. L. Capurro. 2014.** Mass production of genetically modified *Aedes aegypti* for field releases in Brasil. J. Vis. Exp. (83): 3579.
71. **Catteruccia, F., J.P. Benton, A. Crisanti. 2005.** An *Anopheles* transgenic sexing strain for vector control. Nat. Biotechnol. 23:1414-1417
72. **Cayol, J. P., J. Vilardi, E. Rial, and M. T. Vera. 1999.** New indices and method to measure the sexual compatibility and mating performance of *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) laboratory-reared strains under field cage conditions. Journal of Economic Entomology 92: 140–145.

73. **Cayol, J. P. 2000.** Changes in sexual behavior and life history traits of tephritid species caused by massrearing processes, pp. 843–860. *In* M. Aluja and A. L. Norrbom (eds.), Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution of behavior. CRC Press, Boca Raton, FL, USA
74. **Cayol, J. P., P. Coronado, and M. Taher. 2002.** Sexual compatibility in medfly (Diptera: Tephritidae) from different origins. *Florida Entomologist* 85: 51–57. <http://www.fcla.edu/FlaEnt/fe85p51.pdf>
75. **Chambers, G.M., and Klowden M.J. 1990.** Correlation of nutritional reserves with a critical weight for pupation in larval *Aedes aegypti* mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc* 6: 394–399
76. **Chambers, G.M., and Klowden M.J. 2001.** Age of *Anopheles gambiae* Gilles male mosquitoes at time of mating influences female oviposition. *J. Vector. Ecol.* 26: 196-201.
77. **Charlwood, J.D., J. Pinto, C.A. Sousa, C. Ferreira, and V.E. Do Rosario. 2002.** Male size does not affect mating success (of *Anopheles gambiae* in Sao Tome). *Med. Vet. Entomol.* 16: 109-113.
78. **Christopher, S.R. 1960.** *Aedes aegypti* (L.) The yellow fever mosquito, Cambridge University Press London, 739 pp.
79. **Clarke, G.M., and L.J. McKenzie. 1992.** Fluctuating asymmetry as a quality control indicator for insect mass rearing processes. *J. Econ. Entomol.* 85: 2045-2050.
80. **Clements, A.N. 1992.** Spermatogenesis and the structure of spermatozoa. *In* The biology of mosquitoes, Development, Nutrition and Reproduction Volume 1. Edited by: Clements AN. London: Chapman & Hall; 333-335.
81. **Cook, P.E., C.J. McMeniman, S.L. O’Neill. 2008.** Modifying insect population age structure to control vector-borne disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 627: 126-140.
82. **Crompton, B., J.C. Thomason, and A. McLachren. 2003.** Mating in viscous universe: the race is to the agile, not to the swift. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 270: 1991-1995.
83. **Cui, K.L. 1982.** The autogeny of *Aedes albopictus* in Gunangzhou arca. *Acta Entomol Sin* 25(3): 256-259.
84. **Curtis, C. F. 1968.** Radiation sterilization and effect of multiple mating of females of *Glossina austeni*. *Journal of Insect Physiology* 14: 1356–1380.
85. **Curtis, C. F. 1970.** The stimulation of emergence from *Glossina* pupae with gamma rays. *Acta Trop.* 27: 89-93.
86. **Dame, D.A., Curtis, C.F. M.Q. Benedict, A.S. Robinson, B.G.J. Knols. 2009.** Historical applications of induced sterilisation in field populations of mosquitoes. *Malaria Journal* 8(Suppl 2): S2

87. **Damiens, D., M. Q. Benedict, M. Wille, and J. R. L. Gilles. 2012.** An inexpensive and effective larval diet for *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae): eat like a horse, a bird, or a fish? *J. Med. Entomol.* 49: 1001–1011.
88. **Dapples, C.C., W.A. Foster, A.O. Lea. 1974.** Ultrastructure of the accessory gland of the male mosquito, *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 3: 279–291.
89. **David, A. S., Kaser J. M., Morey A. C, Roth A. M., and Andow D. A. 2013.** Release of genetically engineered insects: a framework to identify potential ecological effects. *Ecology and Evolution* 3(11): 4000–4015
90. **Delatte, H., Dehecq J.S., Thiria J., Domerg C., Paupy C., Fontenille D. 2008.** Geographic distribution and developmental sites of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) during a chikungunya epidemic event. *Vector Borne Zoonotic Dis.*;8(1):25–34.
91. **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. *J. Med. Entomol.* 46(1): 33-41
92. **Del Rosario, A. 1963.** Studies on the biology of Philippine mosquitoes. II. Observations of the life and behaviour of *Aedes albopictus* (Skuse) in the laboratory. *Phil J Sci.* 92:89–103
93. **Dickerson, C.Z. 2007.** The effects of temperature and humidity on the eggs of *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) in Texas. Texas: Texas A&M University. 119p.
94. **Dieng, H, Saifur RG, Hassan AA, Salmah MR, Boots M, Satho T, et al. 2010.** Indoor-breeding of *Aedes albopictus* in northern peninsular Malaysia and its potential epidemiological implications. *PLoS ONE.* 5(7):e11790.
95. **Dyck, V.A., editor, J. Hendrichs, editor, and A.S. Robinson, editor. 2005.** Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
96. **Dye, C. 1984.** Models for the population dynamics of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *J Animal Ecol.* 53:247-268.
97. **ECDC European Centre for Disease Prevention and Control. 2009.** Development of *Aedes albopictus* risk maps ECDC Technical report 2009. Stockholm; Stockholm>Sweden: [cited Jun 19, 2009]  
[http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0905\\_TER\\_Development\\_of\\_Aedes\\_Alboipictus\\_Risk\\_Maps.pdf](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0905_TER_Development_of_Aedes_Alboipictus_Risk_Maps.pdf)
98. **ECDC European Centre for Disease Prevention and control 2012.** Guidelines for the surveillance of invasive mosquitoes in Europe. Stockholm: ECDC

99. **ECDC European Centre for Disease Prevention and control 2018.** Mosquito maps [internet]. Stockholm.  
<https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/aedes-albopictus-current-known-distribution-january-2018>
100. **Edman, J.D., J.S. Haeger, W.L. Bidlingmayer, R.P. Dow, J.K. Nayar, and M.W. Provost 1972.** Sexual behavior of mosquitoes. 4. Field observations on mating and insemination of marked broods of *Aedes taeniorhynchus*. Ann. Entomol. Soc. Am. 65: 848–852.
101. **Enserink, M. 2008.** A mosquito goes global. Science 320: 864-866.
102. **Erickson, R.A, Presley S,M, Allen L,J,S,, Long K,R,, Cox S,B. 2010.** A stage-structured, *Aedes albopictus* population model. Ecol Modell. 221(9):1273–82
103. **Estrada-Franco, J.G. and G.B.Craig. 1995.** Biology, disease relationships, and control of *Aedes albopictus*. Pan American Health Organisation. Technical paper No. 42: 49 p.
104. **FAO/IAEA/USDA. 2003.** Manual for product quality control and shipping procedures for sterile mass-reared tephritid fruit flies, fifth ed. IAEA, Vienna, pp. 1-84
105. **FAO/IAEA/USDA. 2014.** Product quality control for sterile mass-reared and released Tephritid fruit flies, Version 6.0. Vienna, Austria: IAEA
106. **Fay, H. A. C., and A. Meats. 1987.** The sterile insect release method and the importance of thermal conditioning before release: field-cage experiments with *Dacus tryoni* in spring weather. Australian Journal of Zoology 35: 197–204
107. **Focks, D.A., S.B. Linda, G.B. Craig, W.A. Hawley and C.P. Pumpuni. 1994.** *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): A statistical model of the role of temperature, photoperiod, and geography in the induction of egg diapause. J. Med. Entomol. 31: 278-286.
108. **Foster, W.A., 1995.** Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. Annu. Rev. Entomol., 40.
109. **Franz G. 2005.** Genetic sexing strains in Mediterranean fruit fly, an example for other species amenable to large-scale rearing as required for the sterile insect technique. In Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management Edited by: Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2005:427-451
110. **Fried, M. 1971.** Determination of sterile-insect competitiveness. J. Econ. Entomol. 64: 869-872
111. **Galliard H, and Golvan YJ. 1957.** Influences de certains facteurs nutritionnels et hormonaux a des temperatures variables, sur la croissance des larves d'*Aedes (S.) aegypti*, *Aedes (S.) albopictus* et *Anopheles (M.) stephensi*. [Effects of certain nutritional and hormonal factors at various temperatures on growth of the larvae of *Aedes (S.) aegypti*, *Aedes (S.) albopictus* and *Anopheles (M.) stephensi*]. Ann Parasitol Hum Comp.32(5–6):563–79 (in French).

112. **Galliard H. 1958.** Recherches sur la biologie des Culicides a Hanoi (tonkin, Nord Vietnam). I. Developpement larvaire comparative de differentes souches d'*Aedes albopictus*, *A. aegypti*, *Culex fatigans* et *Armigeres obturbans*. [Findings on the biology of Culicidae in Hanoi (Tonkin, North Vietnam). I. Comparative larval development of various strains of *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti*, *Culex fatigans* & *Armigeres obturbans*]. Ann Parasitol Hum Comp. 33(1-2):131-44 (in French).
113. **Gentile, J.E., Rund, S.S.C., Madey G.R. 2015.** Modelling sterile insect technique to control the population of *Anopheles gambiae*. Malaria Journal. 14:92
114. **Gomes, A.deC., S.L. Davidson Gotlieb; C.C.deA. Marques, M. Bicudo de Paula; Marques GRAM. 1995.** Duration of larval and pupal development stages of *Aedes albopictus* in natural and artificial containers. Rev. Saúde Pública vol.29 no.1 São Paulo Feb. 1995
115. **Gratz, N. G. 2004.** Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. Med. Vet. Entomol. 18: 215-227.
116. **Gubler, D.J. 1970 a.** Comparioson of reproductive potentials of *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse and *Aedes (Stegomyia) polynesiensis* Marks. Mosquito News. 30: 201-209.
117. **Gubler, D.J. 1970 b.** Competitive displacement of *Aedes (Stegomyia) polynesiensis* Marks by *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse in laboratory populations. J Med Entomol.;7(2):229-35.
118. **Halcrow JG. 1955.** Notes on a laboratory colony of *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) and its distribution in Mauritius. Proc R Entomol Soc Lond.;30:40-2.
119. **Hallinan, E., and K. S. Rai. 1973.** Radiation sterilization of *Aedes aegypti* in nitrogen and implications for sterile male technique. Nature 244: 368-369
120. **Hamady, D., Ruslan N.B., Ahmad A.H., Rawi C.S., Ahmad H., Satho T., Miake F., Zuharah W.F., FuKumitsu Y., Saad A.R., Rajasaygar S., Vargas R.E., Majid A.H., Fadzly N., Ghani I.A., AbuBakar S. 2013.** Colonized *Aedes albopictus* and its sexual performance in the wild: implications for SIT technology and containment. Parasit. Vectors 6: 206
121. **Harris, A. F., D. Nimmo, A.R. McKemey, N. Kelly, S Scaife, C.A. Donnelly, C. Beech, W.D. Petrie, L. Alphey. 2011.** Field performance of engineered male mosquitoes. Nat. Biotechnol 29: 1034-1037
122. **Harris, A. F., A.R. McKemey, D. Nimmo, Z. Curtis, I. Black, S.A. Morgan, M.N. Oviedo, R. Lacroix, N. Naish, N.I. Morrison, A. Collado, J. Stevenson, S. Scaife, T. Dafa'alla, G. Fu, C. Phillips, A. Miles, N. Raduan, N. Kelly, C. Beech, C.A. Donnelly, W.D. Petrie, L. Alphey. 2012.** Successful suppression of a field mosquito population by sustained release of engineered male mosquitoes. Nature Biotechnol 30: 828-830
123. **Hawley, W.A., P. Reiter, R.S. Copeland, C.B. Pumpuni, G.B. Jr. Craig. 1987.** *Aedes albopictus* in North America: probable introduction in used tires from Norther Asia. Sciene 236: 1114-1116.



124. **Hawley, W.A. 1988.** The biology of *Aedes albopictus*. Journal of the American Mosquito Control association (suppl): 1-40.
125. **Helinski, M.E., R. Hood-Nowotny, L. Mayr, B.G. Knols. 2007.** Stable isotopemass spectrometric determination of semen transfer in malaria mosquitoes. J Exp Biol. 210:1266-1274.
126. **Helinski, M.E.H., M.M. Hassan, W.M. El-Motasim, C.A. Malcom, B.G.J. Knols, B. El-Sayed. 2008.** Towards a sterile insect technique field release of *Anopheles arabiensis* mosquitoes in Sudan: Irradiation, transportation, and field cage experimentation. Malar. J. 7:65
127. **Helinski, M.E.H., A.G. Parker, B.G.J. Knols. 2009.** Radiation biology of mosquitoes. Review. Malaria Journal. 8(Suppl. 2): S6
128. **Hendrichs, J., V. Wornoayporn, B. I. Katsoyanos, K. Gaggl. 1993.** First field assessment of the dispersal and survival of mass reared sterile Mediterranean fruit fly of an embryonal temperature sensitive genetic sexing strain, pp. 453 – 462. *In* Proceedings: Management Of Insect Pest: Nuclear and Related Molecular and Genetic Techniques. FAO/IAEA International Symposium, 19 – 23 October 1992, Vienna, Austria. STI/PUB/909. IAEA, Vienna, Austria.
129. **Hendrichs J., M. J. B. Vreysen, W. R. Enkerlin, J. P. Cayol. 2005.** Strategic options in using sterile insects for area-wide integrated pest management. pp. 563–600. *In* V. A. Dyck, J. Hendrichs and A. S. Robinson (eds.), Sterile Insect Technique. Principles and Practice
130. **Hien, D.S. 1975.** Biology of *Aedes aegypti* (L. 1762) and *Aedes albopictus* (Skuse, 1895) (Diptera, Culicidae). III. Effect of certain environmental conditions on the development of larvae and pupae. Acta Parasitol Pol. 23:553–68.
131. **Hoang, K.P., Teo T.M., Ho T.X., and Le V.S. 2016.** Mechanisms of sex determination and transmission ratio distortion in *Aedes aegypti*. Parasit Vectors 9:49
132. **Hoffmann, A.A., B.L. Montgomery, J. Popovici, I. Iturbe-Ormaetxe, P.H. Johnson, F. Muzzi, M. Greenfield, M. Durkan, Y.S. Leong, Y. Dong, H. Cook, J. Axford, A.G. Callahan, N. Kenny, C. Omodei, E.A. McGraw, P.A. Rayan, S.A. Ritchie, M. Turelli, S.L. O’Neill. 2011.** Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. Nature. 476:454–456.
133. **Hoffmann, A.A. and Ross P.A. 2018.** Rates and patterns of laboratory adaptation in (Mostly) insects. Journal of Economic Entomology XX(X): 1-9 doi: 10.1093/jee/toy024
134. **Hong, H.K., J.C. Shim and Young, H.Y. 1971.** Hibernation studies of forest mosquitoes in Korea. Korean Journal of Entomology 1: 13-16
135. **Honorio, N.A., W.C. Silva, P.J. Leite, P.J., J.M. Goncalves, L.P. Lounibos, R. Lourenco-de-Oliveira. 2003.** Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban

- endemic dengue area in the state of Rio de Janeiro, Brasil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 98(2): 191-198.
136. **Hooper, G.H.S., and K. P. Katiyar. 1971.** Competitiveness of Gamma-sterilized males of the Mediterranean fruit fly. *J. Econ. Entomol.* 64: 1068-1071.
  137. **Horber, E. 1963.** Eradication of the white grub (*Melolontha vulgaris* F.) by the sterile male technique, pp. 313–332. *In* Proceedings, Symposium: Radiation and Radioisotopes Applied to Insects of Agricultural Importance. FAO/IAEA, 22–26 April 1963, Athens, Greece. STI/PUB/74. IAEA, Vienna, Austria.
  138. **Huho, B.J., K.R. Ng'habi, G.F. Killeen, G. Nkwengulila, B.G.J. Knols, and H.M. Ferguson. 2006.** A reliable morphological method to assess the age of male *Anopheles gambiae*. *Malar. J.* 5: 26.
  139. **Huho, B.J., K.R. Ng'habi, G.F. Killeen, G. Nkwengulila, B.G.J. Knols, and H.M. Ferguson. 2007.** Nature beats nurture: a case study of the physiological fitness of free-living and laboratory-reared *Anopheles gambiae* s. l. *J. Exp. Biol.* 210:2939-2947.
  140. **IAEA - International Atomic Energy Agency. 2005.** Sterile Insect Technology – research and development.  
[https://www.iaea.org/About/Policy/GC/GC50/GC50InfDocuments/English/gc50inf-3-att4\\_en.pdf](https://www.iaea.org/About/Policy/GC/GC50/GC50InfDocuments/English/gc50inf-3-att4_en.pdf)
  141. **IAEA - International Atomic Energy Agency. 2006.** Designing and implementing a Geographical Information System. A guide for managers of Area-wide pest management programmes. Printed by the IAEA/FAO-GIS, Vienna, Austria
  142. **IAEA- International Atomic Energy Agency. 2010.** Biology of male mosquitoes in relation to genetic control programmes. Report of the Second Research Coordination Meeting of an FAO/IAEA Coordinated Research Project, held in Vienna, Austria, from 1 to 5 February 2010. Reproduced by the IAEA, Vienna, Austria 2010. Limited edition. <http://www-naweb.iaea.org/nafa/ipc/crp/2nd-RCM-Biology-of-mosquitoes-2010.pdf>
  143. **IAEA- International Atomic Energy Agency. 2013.** Co-ordinated research programme on Explore mechanical, molecular, behavioral or genetic methods of sex separation in mosquitoes. First research co-ordination meeting Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. 30<sup>th</sup> September-4<sup>th</sup> October 2013, IAEA Headquarters, Vienna, Austria.  
<https://nucleus.iaea.org/sites/naipc/dirsit/SitePages/World-Wide%20Directory%20of%20SIT%20Facilities%20%28DIR-SIT%29.aspx>
  144. **IAEA – International Atomic Energy Agency. 2014a.** Thematic plan for the development and application of the Sterile Insect Technique (SIT) and related genetic and biological control methods for disease transmitting mosquitoes. Meeting 16<sup>th</sup>-20<sup>th</sup> June 2014, IAEA, Vienna, Austria

145. **IAEA – International Atomic Energy Agency. 2014b.** Mosquito handling, transport and release methods. Report of a consultant group meeting held in Vienna, Austria, 8-12 December 2014.
146. **IAEA – International Atomic Energy Agency. 2016.** Sterile Insect Technique. IAEA, Vienna, Austria. <http://www-naweb.iaea.org/nafa/ipc/sterile-insect-technique.html>
147. **Iturbe-Ormaetxe, I., T. Walker, S.L. O’Neill. 2011.** *Wolbachia* and the biological control of mosquito-borne disease. European Molecular Biology Organization (EMBO): 12(6): 508-518
148. **Iwahashi, O., Y. Itô, and M. Shiyomi. 1983.** A field evaluation of the sexual competitiveness of the sterile melon fly, *Dacus (Zeugodacus) cucurbitae*. Ecological Entomology 8: 43–48.
149. **Jones, J.C.1973.** A study on the fecundity of male *Aedes aegypti*. J. Insect Physiol. 19: 435–439.
150. **Judson, C.L. 1963.** The physiology of hatching of aedine mosquito eggs: Carbon monoxide stimulation and ethyl chloride inhibition of hatching of *Aedes aegypti* (L.) eggs. J. Insect. Physiol. 9: 787-792.
151. **Kaiser, P.E., J.A. Seawright, D.A. Dame, D.J. Joslyn. 1978.** Development of a genetic sexing system for *Anopheles albimanus*. J Econ Entomol. 71:766-771.
152. **Kambris, Z., P.E. Cook, H.K. Phuc, S.P. Sinkins. 2009.** Immune activation by life shortening *Wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes. Science 326: 134–136.
153. **Kambris, Z., A.M. Blagborough, S.B. Pinto, M.S. Blagrove, H.C. Godfray, R.E. Sinden, S.P. Sinkins. 2010.** *Wolbachia* stimulates immune gene expression and inhibits plasmodium development in *Anopheles gambiae*. PLoS Pathog 6: e1001143
154. **Katsoyannos, B. I., N. T. Papadopoulos, J. Hendrichs, and V. Wornoayporn. 1999.** Comparative response to citrus foliage and citrus fruit odour by wild and mass reared sterile Mediterranean fruit fly males of a genetic sexing strain. Journal of Applied Entomology 123: 139–143.
155. **Kean, J. M., S. L. Wee, A. E. A. Stephens, and D. M. Suckling. 2005.** Population models for optimizing SIT eradication strategies, pp. 150 – 151. *In* Book of Extended Synopses. FAO/IAEA International Conference on Area-wide Control of Insect Pests: Integrating the Sterile Insect and Related Nuclear and Other Techniques, 9 – 13 May 2005, Vienna, Austria, Poster Number IAEA-CN-131/20P. IAEA, Vienna, Austria.
156. **Kelly, R., and J.D. Edman. 1992.** Mosquito size and multiple transmission of avian malaria in the laboratory. J. Am. Mosq. Control. Assoc. 8: 386-388.
157. **Keng-Hong, T. 2000.** Area-wide control of fruit flies and other insect pests. Penerbit Universiti, Sains Malaysia.
158. **Klassen, W. 2005.** Area-Wide Integratenique Pest Management and the Sterile Insect Technique, *In*: Dyck, VA, Hendrichs, J, Robinson, AS, eds. 2005. Sterile Insect Technique. Principles and

- Practice in Area-Wide Integrated Pest Management. Dordrecht, The Netherlands: Springer, pp. 39-69
159. **Klowden , M.J. 1990.** The endogenous regulation of mosquito reproductive behavior. *Experientia* 46: 660-670
  160. **Klowden, M., and G. Chambers. 1992.** Reproductive and metabolic differences between *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 29: 467-471.
  161. **Klowden, MJ. 1996.** Endogenous factors regulating mosquito host-seeking behaviour. *Ciba Found Sym*, 200:212–225.
  162. **Klowden, M.J. 1999.** The check is in the male: male mosquitoes affect female physiology and behavior. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 15(2):213-220
  163. **Klowden, M.J., and G.M. Chambers. 2004.** Production of polymorphic sperm by anopheline mosquitoes and their fate within female genital tract. *J. of Insect Physiol.* 50: 1163-1170
  164. **Knipling, E. F. 1955.** Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *J. Econ. Entomol.* 48: 459–462.
  165. **Knipling, E.F., H. Laven, G.B. Craig, R. Pal, C.N. Smith, A.W.A. Brown.1968.** Genetic control of insects of public health importance. *Bull World Health Organ*, 38:421-438.
  166. **Knipling, E. F. 1979.** *The Basic Principles of Insect Population Suppression and Management.* Agriculture Handbook No. 512. Washington, DC:USDA.
  167. **Knipling, E.F. 1998.** Role of parasitoid augmentation and sterile insect techniques for area-wide management of agricultural insect pests. *J. Agric. Entom.* 15:273-301.
  168. **Knols, B.G.J., B.N. Njiru, E.M. Mathenge, W.R. Mukabana, J.C. Beier, G.F. Killeen. 2002.** Malaria Sphere: A greenhouse-enclosed simulation of a natural *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) ecosystem in western Kenya. *Malar J.* 1:19.
  169. **Knudsen, A.B. 1995.** Global distribution and continuing spread of *Aedes albopictus*. *Parassitologia* 37(2-3): 91-97
  170. **Koenraadt, C.J.M. 2008.** Pupal dimensions as predictors of adult size in fitness studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 45(2):331-336.
  171. **Kohama, T., M. Yamagishi, H. Kuba, and K. Kinjo. 2003.** A progress report on the eradication program of the sweet potato weevil, *Cylas formicarius* (Fabricius) (Coleoptera: Brentidae), with both male annihilation using sex pheromone and sterile insect releases in Kume Island, Okinawa, Japan, pp. 65–69. *In* Recent trends on sterile insect technique and area-wide integrated pest management —economic feasibility, control projects, farmer organization and *Bactrocera dorsalis* complex control study. Research Institute for Subtropics, Okinawa, Japan.

172. **Krafsur, E. S. 1998.** Sterile insect technique for suppressing and eradicating insect populations: 55 years and counting. *J. Agric. Entomol.* 15:303-317.
173. **Labbé, G.M.C., D.D. Nimmo, L. Alphey. 2010.** *piggybac*- and PhiC31-Mediated genetic transformation of the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse). *PLoS Negl Trop Dis* 4(8): e788.
174. **Labbé, G. M. C., S. Scaife, S.A. Morgan, Z. H. Curtis, L. Alphey. 2012.** Female-Specific Flightless (fsRIDL) Phenotype for Control of *Aedes albopictus*. *PLoS Negl Trop Dis* 6(7): e1724. doi:10.1371/journal.pntd.0001724
175. **Lacroix, R., H. Delatte, T. Hue, P. Reiter. 2009.** Dispersal and survival of male and female of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) on Reunion Island. *J. Med. Entomol.* 46: 1117-1124.
176. **Lacroix R., A.R. McKemey, N. Raduan, L.K. Wee, W.H. Ming, T.G. Ney, S. Rahidah, S. Salman, S. Subramaniam, O. Nordin, N. Hanum, C. Angamuthu, S.M. Mansor, R.S. Lees, N. Naish, S. Scaife, P. Grey, G. Labbe, C. Beech, D. Nimmo, L. Alphey, S.S. Vasan, L.H. Lim, N. Wasi, S. Murad. 2012.** Open field release of genetically engineered sterile male *Aedes aegypti* in Malaysia. *PLoS ONE*.7(8):e42771.
177. **Lance, D. R., MCInnis, D. O. 2005.** Biological basis of the sterile insect technique. In: Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS, editors. Sterile insect technique. Principles and practice in area-wide integrated pest management. The Netherlands: Springer; 2005. pp. 69-94
178. **Latter, B.D., and J.C. Mulley. 1995.** Genetic adaptation to captivity and inbreeding depression in small laboratory populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*: 139(1): 255-266.
179. **Laven, H. 1967.** Eradiction of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmic incompatibility. *Nature* 216: 383-384.
180. **Laven, H., J. Cousserans, G. Guille. 1971.** Experience de lutte genetique contre *Culex pipiens* dans la région de Montpellier. *Bull. Biologique* 105: 358-367.
181. **Lee, S.J. 1994a.** Bloodsucking, Oviposition and Logevity of *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae). *Chinese Journal Entomology*, 14: 217-231 (1994).
182. **Lee, S.J. 1994b.** Development of eggs, larvae and pupae of *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera:Culicidae). *Chin J Entomol.*;14:13–32 (in Chinese).
183. **LaChance, L.E.1967.** The induction of dominant lethal mutations in insects by ionizing radiation and chemicals-as related to the sterile male technique of insect control. In *Genetics of Insect Vectors of Disease* Edited by: Wright JW, Pal R. Amsterdam: Elsevier, 617-650
184. **Leahy, M.G.L. and Craig G.B. 1967.** Barriers to hybridization between *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). Department of Biology, University of Notre Dame, Notre Dame, Indiana

185. **Lees, R.S., J.R.L. Gilles, J. Hendrichs, M.J.B. Vreysen, K. Bourtzis. 2015.** Back to the future: the sterile insect technique against mosquito disease vectors. *Insect Science*. 10: 156-162
186. **Leftwich, P.T., M. Bolton, T. Chapman. 2016.** Evolutionary biology and genetic techniques for insect control. *Evolutionary Applications*, 9: 212–230. doi: 10.1111/eva.12280  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eva.12280/full>
187. **Liggett, A.C., I.F. Harvey, and J.T. Manning. 1993.** Fluctuating asymmetry in *Scatophaga sterocoraria* L.: successful males are more symmetrical. *Anim. Behav.* 45: 1041-1043.
188. **Lima-Camara, T.N., Honório N.A., Lourenço-de-Oliveira, R. 2007.** Parity and ovarian development of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae) in metropolitan Rio de Janeiro. *J Vector Ecol*, 32:34–40.
189. **Lima-Camara TN, Lima JBP, Bruno RV, Peixoto AA. 2014.** Effects of insemination and blood-feeding on locomotor activity of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females under laboratory conditions. *Parasit Vectors*. 2014;7:304. doi: 10.1186/1756-3305-7-304.
190. **Lindquist, D. A., M. Abusowa, M. J. Hall. 1992.** The New World screwworm fly in Libya: a review of its introduction and eradication. *Med. Vet. Entomol.* 6:2-8
191. **Livingstone, D, and Krishnamoorthy K. 1985.** Studies on the active patterns of the larvae and adults of *Aedes albopictus* (Skuse) and *Aedes vittatus* (Bigot) of the scrub jungles of Palghat- Gap, India. *J Bombay Nat Hist Soc.*82:30–7.
192. **Lofgren, C. S., D. A. Dame, S. G. Breeland, D. E. Weidhaas, G. M. Jeffery, R. Kaiser, H. R. Ford, M. D. Boston, K. F. Baldwin. 1974.** Release of chemosterilized males for the control of *Anopheles albimanus* in El Salvador III. Field methods and population control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 23:288-297.
193. **Lowe, R., E. Fowler, D. Bailey, D. Dame, K. Savage. 1981.** Separation of sexes of adult *An. albimanus* by feeding of insecticide-laden blood. *Mosq News*. 41:634–638.
194. **Macdonald, W.W. 1956.** *Aedes aegypti* in Malaya. II- Larval and adult biology. *Ann Trop Med Parasitol*, 50:399–414.
195. **Maciel-de Freitas, R., C.T. Codeco, and R. Lourenco-de-Oliveira. 2007.** Body size-associated survival and dispersal rates of *Aedes aegypti* in Rio de Janeiro. *Med. Vet. Entomol.* 21(3): 284-292.
196. **Maciel-de Freitas, R., Eiras Á. E., Lourenco -de-Oliveira et R. 2008** Calculating the survival rate and estimated population density of gravid *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saude Publica*; 24(12):2747-54
197. **Mackenzie, A., J.D. Reynolds, V.J. Brown, and W.J. Sutherland. 1995.** Variation in male mating success at leks. *Am. Nat.* 146: 633-652.

198. **Madakacherry, O., R. S. Lees, and J.R.L. Gilles. 2014.** *Aedes albopictus* (Skuse) males in laboratory and semi-field cages: release ratios and mating competitiveness. *Acta Trop.* 132, Supplement: 124-129.
199. **Magnarelli, L., 1983.** Nectar sugars and caloric reserves in natural populations of *Aedes canadensis* and *Aedes stimulans* (Diptera: Culicidae). *Environ. Entomol.* 12: 1482–1486.
200. **Mahmood, F.,W.K. Reisen.1982.** *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae): changes in male mating competence and reproductive system morphology associated with aging and mating. *J. Med. Entomol.* 19: 573–588.
201. **Maïga, H., R.K. Dabiré, T. Lehmann, F. Tripet, and A. Diabaté. 2012.** Variation in energy reserves and role of body size in the mating system of *Anopheles gambiae*. *J. Vector. Ecol.* 37 (2): 298-297
202. **Maïga, H., D. Damiens, A. Niang, S.P. Sawadogo, O. Fatherhaman, R.S. Lees, O. Roux, R.K. Dabire, G.A. Ouedraogo, F. Tripet, A. Diabate, J.R.L. Gilles. 2014.** Mating competitiveness of sterile male *Anopheles coluzzi* in large cages, *Malaria Journal.* 13: 460
203. **Mains, J. 2007.** Mosquito Wing Length Measurement (Ocular and ImageJ Methods). Version 4.
204. **Malcom, C.A., B. El Sayed, A. Babiker, R. Girod, D. Fontenille, B.G.J. Knols, A.H. Nugud, M.Q. Benedict. 2009.** Field site selection: getting it right first time around. Review. *Malaria Journal.* 8(Suppl 2):S9
205. **Maor, M., B. Kamensky, S. Shloush, and B. Yuval. 2004.** Effects of post-teneral diet on foraging success of sterile male Mediterranean fruit flies. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 110: 225–230.
206. **Marelli, M.T., C. K. Moreira, D. Kelly, L. Alphy, and M. Jacobs-Lorena. 2006.** Mosquito transgenesis: what is the cost? *Trends Parasitol.* 22(5): 197-202.
207. **Marini F., B. Caputo, M. Pombi, G. Tarsitani, A. della Torre. 2010.** Study of *Aedes albopictus* dispersal in Rome, Italy, using sticky traps in mark-release recapture experiments. *Med Vet Entomol.* 24: 361–368
208. **Massonnet-Burneel, B., N. Corre-Catelin, R. Lacroix, R.S. Lees, K. P. Hoang, D. Nimmo, L. Alphey, and P. Reiter 2013.** Fitness of transgenic mosquito *Aedes aegypti* males carrying a dominant lethal genetic system. *PLoS ONE* 8(5): e62711 DOI: 10.1371/journal.pone.0062711
209. **McGraw, E.A. and S.L. O’Neill. 2013.** Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. Review. *Nature Reviews Microbiology.* 11: 181-193
210. **McLachlan, A., and M. Cant. 1995.** Small males are more symmetrical: mating success in the midge *Chironomus pluosus* (Diptera: Chironomidae). *Anim. Behav.* 50: 841-846.

211. **McMeniman, C.J., G.L. Hughes, S.L. O'Neill. 2011.** A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* disrupts mosquito egg development to a greater extent when mosquitoes feed on nonhuman versus human blood. *J Med Entomol.* 48:76–84.
212. **Menge, D.M., T. Guda, D. Zhong, A. Pai, G. Zhou, J.C. Beier, L. Gouagna, and G. Yan. 2005.** Fitness consequences of *Anopheles gambiae* population hybridization. *Malaria Journal* 4:44.
213. **Meats, A. 1998.** A quality assurance measure for field survival rates of released sterile flies based on recapture rates. *General and Applied Entomology* 28: 39–46.
214. **Miyatake, T. 1993.** Difference in the larval and pupal periods between mass-reared and wild strains of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae). *Applied Entomology and Zoology* 28: 577-581.
215. **Miyatake, T. and D. Haraguchi. 1996.** Mating success in *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) under different rearing densities. *Amm. Entomol. Soc. Am.* 89: 284-289.
216. **Miyatake, T. 1998a.** Genetic changes of life history and behavioral traits during mass-rearing in the melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae). *Researches on Population Ecology* 40: 301-310.
217. **Miyatake, T. 1998b.** Genetic variation in pre-mating period of the mass-reared melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae). *Applied Entomology and Zoology* 33: 29–33
218. **Miyatake, T., and M. Yamagishi. 1999.** Rapid evolution of larval development time during mass-rearing in the melon fly, *Bactrocera cucurbitae*. *Researches on Population Ecology* 41: 291–297.
219. **Miyatake, T. 2002.** Circadian rhythm and time of mating in *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) selected for age at reproduction. *Heredity* 88: 302–306.
220. **Milby, M.M., R.L. Nelson, P.T. McDonald. 1980.** Release of heterozygous translocated adult males for genetic control of *Culex tarsalis* at an isolated site. *Mosq. Systematics* 40, 83–90
221. **Miller, B.R. and Ballinger, M.E. 1988.** *Aedes albopictus* mosquitoes introduced into Brazil: vector competence for yellow fever and dengue viruses. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82(3): 476-477.
222. **Mitton, J.B., and M.C. Grant. 1994.** Associations among protein heterozygosity, growth rate and developmental homeostasis. *A. Rev. Ecol. Syst.* 15: 479-499.
223. **Mokany, A. and R. Shine. 2006.** Competition between tadpoles and mosquito larvae. *Oecologia* 135 (4): 615-620.
224. **Monteiro, L. C.C., de Souza J. R.B., de Albuquerque C. M.R. 2007.** Eclosion rate, development and survivorship of *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) under different water temperatures. *Neotropical Entomology* 36(6):966-971



225. **Montgomery, M.E., L.M. Woodworth, R.K. Nurthen, D.M. Gilligan, D.A. Briscoe, and R. Frankham. 2000.** Relationship between population size and loss of genetic diversity: comparisons of experimental results with theoretical predictions. *Conserv. Genet.* 1: 33-43.
226. **Moreira, L.A., I. Iturbe-Ormaetxe, J.A. Jeffery, G. Lu, A.T. Pyke, L.M. Hedges, B.C. Rocha, S. Hall-Mendelin, A. Day, M. Riegler, L.E. Hugo, K.N. Johnson, B.H. Kay, E.A. McGraw, A.F. van den Hurk, P.A. Ryan, and S.L. O'Neill. 2009.** A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell* 139: 1268–1278
227. **Mori, A. and Y. Wada. 1977.** The gonotrophic cycle of *Aedes albopictus* in the field. *Trop Med.* 19: 141–146
228. **Murray, M.D. and E.N. Marks 1984.** Blood sucking Diptera of Cocos (Keeling) Islands. *Journal of the Australian Entomological Society* 23: 265-268.
229. **Myers, J.H., A. Savoie, E. van Randen. 1998.** Eradication and pest management. *Annual Reviews of Entomology* 43: 471-91.
230. **Nathan, M. and Knudsen, B. 1994.** Global update on *Aedes albopictus*. *American Mosquito Control Association Newsletter* 20: 8-9.
231. **Nayar, J.K., W.A. Samarawickrema & D.M. Sauerman Jr. 1973.** Photoperiodic control of egg hatching in the mosquito *Mansonia titillans*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 66: 831-835
232. **Ng'habi, K.R., B.J. Huho, G. Nkwengulila, G.F. Killeen, B.G.J. Knols, and H.M. Ferguson. 2008.** Sexual selection in mosquito swarms: may the best man lose? *Anim. Behav.* 76: 105-112.
233. **Niebylski, M. L., and G. Craig, Jr. 1994.** Dispersal and survival of *Aedes albopictus* at a scrap tire yard in Missouri. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 10: 339-343.  
[https://archive.org/stream/cbarchive\\_103311\\_dispersalandsurvivalofaedesalb1994/JAMCA\\_V10\\_N3\\_P339-343\\_djvu.txt](https://archive.org/stream/cbarchive_103311_dispersalandsurvivalofaedesalb1994/JAMCA_V10_N3_P339-343_djvu.txt)
234. **Novak, R. 1992.** The asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*. *Wing Beats* 3(3): 5
235. **Nunny, L. 2002.** The population genetics of mass rearing. *In:* N. Leppla C., Bloem K.A., Luck R.F. (eds.). *Quality control for mass-reared arthropods: Proceedings of the 8<sup>th</sup> and 9<sup>th</sup> workshops of the IOBC working group on quality control of mass-reared arthropods.* 43-49.
236. **O'Connor, L., C. Plichart, A.C. Sang, C.L. Brelsfoard, H.C. Bossin, S.L. Dobson. 2012.** Open release of male mosquitoes infected with a *Wolbachia* biopesticide: field performance and infection containment. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1797.
237. **Oliva, C.F., M.Q. Benedict, G. Lamperiere, J. Gilles. 2011.** Laboratory selection for an accelerated mosquito sexual development rate. *Malaria Journal.* 10:135
238. **Oliva, C.F., M. Jacquet, J. Gilles, G. Lemperiere, P.-O. Maquart, S. Quilici, F. Schooneman, M.J.B. Vreysen, S. Boyer. 2012a.** The sterile insect technique for controlling populations of *Aedes*

- albopictus* (Diptera: Culicidae) on Reunion Island: mating vigour of sterilized males. PLoS One 7, e49414.
239. **Oliva, C.F., M.J. Maier, J. Gilles, M. Jacquet, G. Lemperiere, S. Quilici, M.J. Vreysen, F. Schooneman, D.D. Chadee, S. Boyer. 2012b.** Effects of irradiation, presence of females, and sugar supply on the longevity of sterile males *Aedes albopictus* (Skuse) under semi-field conditions on Reunion Island. Acta Trop. 125, 287–293
  240. **Oliva, C.F., D. Damians, M.J.B. Vreysen, G. Lemperiere, J. Gilles. 2013.** Reproductive strategies of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and implications for the Sterile Insect Technique. PLoS ONE 8(11): e78884. doi:10.1371/journal.pone.0078884
  241. **Paaijmans, K.P., Imbahale S.S., Thomas M.B., Takken W. 2010.** Relevant microclimate for determining the development rate of malaria mosquitoes and possible implications of climate change. Malar J. 2010;9:196.
  242. **Paaijmans, K.P., and Thomas M.B. 2011** The influence of mosquito resting behaviour and associated microclimate for malaria risk. Malar J. 2011;10:183
  243. **Pal, R. 1974.** WHO/ICMR programme of genetic control of mosquitoes in India. The use of genetics in insect control, pp. 75-95, Elsevier.
  244. **Palmer, A.R., and C. Storbeck. 1986.** Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. A. Rev. Ecol. Syst. 17: 391-421.
  245. **Papathanos, P.A, Bossin, H.C, Benedict, M.Q, Catteruccia, F, Malcolm, C.A., Alphey, L., Crisanti A. 2009.** Sex separation strategies: past experience and new approaches. Malar J 8:(Suppl 2): S5.
  246. **Parker, AG. 2005.** Mass-rearing for sterile insect release In: Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS, editors. Sterile insect technique. Principles and practice in area-wide integrated pest management. The Netherlands: Springer; 2005. pp 209-232
  247. **Parker, A., and K. Mehta, K. 2007.** Sterile insect technique: a model for dose optimization for improved sterile insect quality. Fla. Entomol. 90, 88–95.
  248. **Parsons, P.A. 1990.** Fluctuating asymmetry: an epigenetic measure of stress. Biol. Rev. 65: 131-145.
  249. **Patterson, R.S., D.E. Weidhaas, H.R. Ford, C.S. Lofgren. 1970.** Suppression and elimination of an island population of *Culex pipiens quinquefasciatus* with sterile males. Science 168: 1368–1370
  250. **Patterson, R.S., R.E. Lowe, B.J. Smittle, D.A. Dame, M.D. Boston, A.L. Cameron. 1977.** Release of radiosterilized males to control *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 14, 299–304.

251. **Paupy, C., H. Delatte, L. Bagny, V. Cobel, and D. Fontenille. 2009.** *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from darkness to the light. *Microbes Infect* 11: 1177-1185.
252. **Pecharsky, B.L., A.R. McIntosh, C.C. Caudill, and J. Dahl. 2002.** Swarming and mating behaviour of mayfly *Baetis bicaudatus* suggest stabilizing selection for male body size. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 51: 530-537
253. **Petrić, D., M. Zgomba, M. Ludwig, N. Becker. 1995.** Dependence of CO<sub>2</sub>-baited suction trap captures on temperature variations. *J Am Mosq Control Assoc* 11:6–10
254. **Petrić, D., M. Zgomba, A. Ignjatović-Ćupina, I. Pajović, E. Merdić, I Boca, A. Klobucar, and N. Landeka. 2006.** Invasion of the *Stegomyia albopicta* to a part of Europe, 15th European Society for Vector Ecology (SOVE) Meeting, Serres, Greece. 10-14 April 2006. Book of Abstracts p. 26. Invited lecture.
255. **Petric, D. 2009** Monitoring of invasive vector mosquitoes and vectorborne diseases (in Serbian). Report to Administration for Environmental Protection, Novi Sad City: 1–9.
256. **Petrić, D., M. Zgomba, A. Ignjatović-Ćupina, I. Pajović, E. Merdić, A. Klobučar, T. Zitko, and N. Landeka. 2009.** Invasion of the *Aedes albopictus* to Eastern Mediterrean Area. International Symposium on the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* and its distribution in relation to bionomic and climatic factors. Spayer. November 2008, Published by German Federal Ministry for the Environment, Nature Conservation and Nuclear Safety in June 2009. P 38-39. [www.bmu.de](http://www.bmu.de)  
Invited lecture
257. **Petrić, D., M.Zgomba, A. Ignjatović Ćupina, D. Marinković, R. Bellini, F. Schaffner, I. Pajović. 2012.** Invasive mosquito species in Europe and Serbia 1979-2011. International Symposium on Current Trends in Plant Protection, Belgrade, Serbia. Proceedings, p.496-505
258. **Petrić, D., R. Bellini, E.-J. Scholte, L.M. Rakotoarivony, F. Schaffner. 2014.** Monitoring population and environmental parameters of invasive mosquito species in Europe. *Parasites and Vectors* 7: 187.
259. **Phuc, H.K., M.H. Andreasen, R.S. Burton, C. Vass, M.J. Epton, G. Pape, G. Fu, K.C. Condon, S. Scaife, C.A. Donnelly, P.G. Coleman, H.White-Cooper, L.Alphey. 2007.** Late acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. *BMC Biol.* 5:11.
260. **Politzar, H., and D. Cuisance. 1984.** An integrated campaign against riverine tsetse flies *Glossina palpalis gambiensis* and *Glossina tachinoides* by trapping and the release of sterile males. *Insect Sci. Appl.* 5: 439–442. In: Dyck, VA, Hendrichs, J, Robinson, AS, eds. 2005. *Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management.* Dordrecht, The Netherlands: Springer

261. **Ponlawat, A., and L.C. Harrington. 2007.** Age and body size influence male sperm capacity of the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 44(3): 422-426.
262. **Ponlawat, A., and L.C. Harrington. 2009.** Factors associated with male mating success of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80: 395–400.
263. **Proverbs, M.D. 1969.** Induced sterilization and control of insects. *Annu RevEntomol* 14: 81–102.
264. **Pudar, D. 2012.** Efekat veličine kaveza na selekciju dužine krila komaraca vrste *Stegomyia albopicta* (Diptera:Culicidae) (Effect of cage size on wing length selection in mosquito species *Stegomyia albopicta* (Diptera:Culicidae), in Serbian. *Diplomski-master rad.* pp. 1-110.
265. **Puggioli, A., F. Balestrino, D. Damiens, R. S. Lees, S. M. Soliban, O. Madakacherry, M. L. Dindo, R. Bellini, and J. R. L. Gilles. 2013.** Efficiency of three diets for larval development in mass rearing *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 50(4): 819-825.
266. **Puggioli, A., Calvitti. M., Moretti. R., Bellini. R. 2016.** wPip *Wolbachia* contribution to *Aedes albopictus* SIT performance: Advantages under intensive rearing. *Acta Tropica* 164 (2016) 473–481
267. **Radesäter, T., and H. Halldórsdóttir. 1993.** Fluctuating asymmetry and forceps size in ear wings, *Forficula auricularia*. *Anim. Behav.* 45: 626-628.
268. **Rasgon, J.L., L.M. Styer, T.W. Scott. 2003.** *Wolbachia*-induced mortality as a mechanism to modulate pathogen transmission by vector arthropods. *J. Med. Entomol.* 40(2):125-132.
269. **Reed, D. H., and R. Frankham. 2003.** Correlation between fitness and genetic diversity. *Conserv. Biol.* 17(1): 230-237.
270. **Reisen, W.K., R.K. Sakai, R.H. Baker, H.R. Rathor, K. Raana, K. Azra, S. Niaz. 1980.** Field competitiveness of *Culex tritaeniorhynchus* Giles males carrying a complex chromosomal aberration: a second experiment. *Ann Entomol Soc Am* 73:479–484.
271. **Reisen, W.K., M.M. Milby, S.M. Asman, M.E. Bock, R.P. Meyer, P.T. McDonald, W.C.Reeves. 1982.** Attempted suppression of a semi-isolated *Culex tarsalis* population by the release of irradiated males: a second experiment using males from a recently colonized strain. *Mosq. News* 42, 565–575
272. **Reisen, W.K. 2003.** Lessons from the past: historical studies by the University of Maryland and the University of California, Berkeley. *Ecological Aspects for Application of Genetically Modified Mosquitoes:* 25–32.
273. **Reiter, P., and D. Sprenger. 1987.** The used tire trade: a mechanism for worldwide dispersal of container breeding mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association* 3(3): 494-501.

274. **Rendon, P., D. McInnis, D. Lance, J. Stewart, 2004.** Medfly (Diptera: Tephritidae) genetic sexing: large-scale field comparison of males-only and bisexual sterile fly releases in Guatemala. *J. Econ. Entomol.* 97, 1547–1553.
275. **Rezza, G., L. Nicoletti, R. Angelini, R. Romi, A.C. Finarelli, M. Panning, P. Cordioli, C. Fortuna, S. Boros, F. Magurano, G. Silvi, P. Angelini, M. Dottori, M.G. Ciufolini, G.C. Majori, and A. Cassone; for the CHIKV study group. 2007.** Infection with Chikungunya virus in Italy: an outbreak in temperate region. *Lancet* 370: 1840-1846.
276. **Rezza, G. 2012.** *Aedes albopictus* and the reemergence of Dengue. *BMC Public Health* 12: 72. doi: 10.1186/1471-2458-12-72
277. **Robinson, A.S. 2002.** Mutations and their use in insect control. *Mutat Res*, 511:113-132.
278. **Robinson, A.S., and Hendrichs J, 2005.** Future development and application. In: Dyck, VA, Hendrichs, J, Robinson, AS, eds. 2005. *Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management.* Dordrecht, The Netherlands: Springer, 727–760
279. **Robinson, A.S., B.G.J. Knols, G. Voigt, J. Hendrichs. 2009.** Conceptual framework and rationale. *Malaria Journal* 8(Suppl 2): S1
280. **Rogers, D., and S. Randolph. 1984.** From a case study to a theoretical basis for tsetse control. *Insect Sci Applic.* 5:419-423.
281. **Rosen, L., L.E. Rozeboom, W.C. Reeves, J. Saugrain, D.J. Gubler. 1976.** A field trial of competitive displacement of *Aedes polynesiensis* by *Aedes albopictus* on Pacific atoll. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 25: 906-913.
282. **Rudnick, A. and Hammon, W. McD. 1960.** Newly recognized *Aedes aegypti* problems in Manila and Bangkok. *Mosquito News.* 20: 247-249.
283. **Rueda, L. 2004.** Pictorial key for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with dengue virus transmission. *Zootaxa* 589: 1-60.
284. **Scott, T.W., E. Chow, D. Strickman, P. Kittayapong, R.A. Wirtz, L.H. Lorenz, J.D. Edman. 1993.** Blood-feeding patterns of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) collected in a rural Thai village. *J Med Entomol.* 30:922–7.
285. **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 Negl Trop Dis.* 2015; 9(11): e0004229. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004229> PMID: 26562521

286. **Shelly, T.E., D.O. McInnis, C. Rodd, J. Edu, E. Pahio. 2007.** Sterile Insect Technique and Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): Assessing the utility of aromatherapy in a Hawaiian coffee field. *J. Econ. Entomol.* 100(2): 273-282
287. **Shimoji, Y., and T. Miyatake. 2002.** Adaptation to artificial rearing during successive generations in the West Indian sweetpotato weevil, *Euscepes postfasciatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Annals of the Entomological Society of America* 95: 735-739.
288. **Siriyasatien, P., T. Pengsakul, V. Kittichai, A. Phumee, S. Kaewsaitiam, U. Thavara, A. Tawatsinnm, P. Asavadachanukorn, M.S. Mulla. 2010.** Identification of blood meal of field caught *Aedes aegypti* (L.) by multiplex PCR. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.*;41:43-47.
289. **Sivanathan, M.M. 2006.** The ecology and biology of *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) and the resistance status of *Aedes albopictus* (fieldstrain) against organophosphates in Penang, Malaysia. Master thesis.
290. **Soemori, H., S. Tsukaguchi, H. Nakamori H. 1980.** Comparison of mating ability and mating competitiveness between mass-reared and wild strains of the melon fly, *Dacus cucurbitae* Coquillett. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology.* 24 (4): 246-250
291. **Sonoda, H. 1972.** The effect of gamma irradiation on fertility and mating competitiveness of the mosquito, *Culex pipiens molestus* F. (Diptera: Culicidae). *Appl. Entomol. Zool.* 7: 103-108.
292. **Sow, A., I. Sidibé, Z. Bengaly, A.Z. Bancé, G.J. Sawadogo, P. Solano, M.J. Vreysen, R. Lancelot, J. Bouyer. 2012.** Irradiated male tsetse from a 40-year-old colony are still competitive in a riparian forest in Burkina Faso. *PLoS One* 7,e37124.
293. **Stabler, R.M. 1945.** Mosquito transmission of disease, Proc. 32nd Annu.Meeting New Jersey Mosquito Extrem Ass. p.119-128.
294. **Takken, W., M.A. Oladunmade, L. Dengwat, H.U. Feldmann, J.A. Onah, S.O. Tenabe, H.J. Hamann. 1986.** The eradication of *Glossina palpalis palpalis* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Glossinidae) using traps, insecticide-impregnated targets and the sterile insect technique in central Nigeria. *Bull. Entomol. Res.* 76, 275-28 In: Dyck, VA, Hendrichs, J, Robinson, AS, eds. 2005. *Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management.* Dordrecht, The Netherlands: Springer
295. **Thomas, D.D., C.A. Donnelly, R.J.Wood, L.S.Alphey. 2000.** Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science.* 287(5462): 2474-2476.
296. **Thornhill, R. 1992.** Female preference for the pheromone of males with low fluctuating asymmetry in the Japanese scorpionfly (*Panorpa japonica*: Mecoptera). *Behav. Ecol.* 3: 277-283.
297. **Trajer, A., T. Hammer, I. Kacsala, B. Tánčzos, N. Bagi, and J. Padisák 2017.** Decoupling of active and passive reasons for the invasion dynamics of *Aedes albopictus* Skuse (Diptera:

- Culicidae): Comparisons of dispersal history in the Apennine and Florida peninsulas. *Journal of Vector Ecology*. Vol. 42, no. 2: 233-242
298. **Tseng, S.M, and Wu I. 1951** An ecological study of mosquitoes in the Wuhan area. *Bull Entomol Res.* 1951;42:527–33.
  299. **Udaka, M. 1959.** Some ecological notes on *Aedes albopictus* in Shikoku, Japan. *Kontyu*;27:202–8.
  300. **van Lenteren, J.C., A. Hale, J.N. Klapwijk, J. Van Schelt, and S. Steinberg. 2003.** Guidelines for quality control of commercially produced natural enemies. In van Lenteren. J.C. (ed.), *Quality control and production of biological control agents: Theory and testing procedures*. CAB International, Wallingford, pp. 265-303
  301. **Vargas-Teran, M., H.C. Hofmann, N.E. Tweddle. 2005.** Impact of screwworm eradication programmes using the sterile insect technique. In: Dyck, VA, Hendrichs, J, Robinson, AS, eds. *Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 629–650.
  302. **Verhoek, B.A., and W. Takken. 1994.** Age effects on the insemination rate of *Anopheles gambiae* s.l. in the laboratory. *Entomol Exp Appl.* 72:167-172.
  303. **Voordouw, M.J., and J.C. Koella. 2007.** Genetic variation of male reproductive success in laboratory population of *Anopheles gambiae*. *Malar. J.* 6:99.
  304. **Voordouw, M.J., J.C. Koella, and H. Hurd. 2008.** Intra-specific variation of sperm length in malaria vector *Anopheles gambiae*: males with shorter sperm have higher reproductive success. *Malar. J.* 7:214.
  305. **Vreysen, M.J.B., K.M.Saleh, M.Y.Ali, A.M. Abdulla, Z.-R, Zhu, K.G, Juma, V.A. Dyck, A.R. Msangi, P.A. Mkonyi, H.U. Feldmann. 2000.** *Glossina austeni* (Diptera: Glossinidae) eradicated on the island of Unguja, Zanzibar, using the sterile insect technique. *J. Econ. Entomol.* 93, 123–135  
In: Dyck, VA, Hendrichs, J, Robinson, AS, eds. *Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. Dordrecht, The Netherlands: Springer
  306. **Vreysen, M.J.B. 2005** Monitoring Sterile and Wild Insects in Area-Wide Integrated Pest Management Programmes in: Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS, editors. *Sterile insect technique. Principles and practice in area-wide integrated pest management*. The Netherlands: Springer; 2005. pp 325-363
  307. **Waldock , J., N. L. Chandra , J. Lelieveld, Y. Proestos , E.Michael , G. Christophides , P.E. Parham. 2013** The role of environmental variables on *Aedes albopictus* biology and chikungunya epidemiology. *Pathog Glob Health.* 2013 Jul; 107(5): 224–241.  
doi:10.1179/2047773213Y.0000000100

308. **Ward, R.A. 1963. Genetics aspects of the susceptibility of mosquitoes to malaria infection.** Exp. Parasitol. 13: 328-341.
309. **Watson, M.S. 1967. Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse): A literature review.** Entomology division. Biological sciences laboratory. Department of the army, Maryland. Miscellaneous publication 22.
310. **Werren, J.H., L. Baldo, and M.E. Clark. 2008. Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology.** Nature Reviews Microbiology 6: 741-751.
311. **Whitlock, M.C. 2002. Selection, Load and Inbreeding Depression in a Large Metapopulation.** Genetics 160: 1191-1202.
312. **Whitten, M., R. Mahon. 2005. Misconceptions and constraints.** In: Dyck, V. A., Hendrichs, J., Robinson, A. S., eds. Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 601-626.
313. **Woodworth, L.M., M.E. Montgomery, D.A. Briscoe, and R. Frankham. 2002. Rapid genetic deterioration in captive populations: Causes and conservation implications.** Conserv. Genet. 3: 277-288.
314. **WHO/EMCA. 2011. WHO/EMCA conference on the vector – related risk of introduction of Chikungunya and Dengue fever and the spread of Ae. albopictus and Ae. japonicus within Europe.** Speyer. Germany, 30-31. May 2011.
315. **Xue, R.D., Barnard D.R., and Ali A. 2009. Influence of multiple blood meals on gonotrophic dissociation and fecundity in Aedes albopictus.** J Am Mosq Control Assoc. 25(4):504–7.
316. **Yamada, H., S.M. Soliban, M.J.B. Vreysen, D.D. Chadee, J.R.L. Gilles. 2013. Eliminating female Anopheles arabiensis by spiking blood meals with toxicants as a sex separation method in the context of the sterile insect technique.** Parasites and Vectors 6:197
317. **Yamada, H., M.J.B. Vreysen, J.R.L. Giles, G. Munhenga, D.D. Damiens. 2014. The effects of genetic manipulation, dieldrin treatment and irradiation on the mating competitiveness of male Anopheles arabiensis in field cages.** Malaria Journal 13:318
318. **Yasuda, K. 2000. Integrated pest management of West Indian sweet potato weevil Euscepes postfasciatus (Fairmaire) and sweet potato weevil Cylas formicarius (Fabricius) in Okinawa, Japan.** <http://www.ffc.agnet.org/library/article/eb493b.html>
319. **Yates, D.M., and A.J. Wolstenholme. 2004. An ivermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel subunit from Dirofilaria immitis.** Int. J. Parasitol. 34:1075–1081
320. **Yuval, B., J.W. Wekesa, and R.K. Washino. 1993. Effect of body size on swarming behaviour and mating success of male Anopheles freeborni (Diptera: Culicidae).** J. Insect Behav. 6:333-342.



321. **Yuval, B., M. Holliday-Hanson, and R.K. Washino. 1994.** Energy budget of swarming male mosquitoes. 1994. *Ecol. Entomol.* 19: 74-78.
322. **Zhong, D., E. Lo, R. Hu, M.E. Metzger, R. Cummings, M. Bonizzoni, K.K. Fujioka, T.E. Sorvillo, S. Klueh, S.P. Healy, C. Fredregill, V.L. Kramer, X. Chen, and G. Yan. 2013.** Genetic analysis of invasive *Aedes albopictus* populations in Los Angeles County, California and its potential public health impact. *PLoS ONE* 8(7): e68586. doi: 10.1371/journal.pone.0068586.
323. **Zhang, D., Lees R.S., Xi Z., Gilles J.R.L., Bourtzis K. 2015** Combining the Sterile Insect Technique with Wolbachia-Based Approaches: II- A Safer Approach to *Aedes albopictus* Population Suppression Programmes, Designed to Minimize the Consequences of Inadvertent Female Release. *PLoS ONE* 10(8): e0135194. doi:10.1371/journal.pone.0135194

## БИОГРАФИЈА

М. Sc. Дубравка Пудар је рођена 17.03.1973. год. у Зеници, Босна и Херцеговина. Основну школу завршила је у Новом Саду, а гимназију у Сремским Карловцима. Основне студије је завршила 1999. год. на Пољопривредном факултету у Новом Саду са просечном оценом 8,89, где је 2010/2011 год. уписала и мастер академске студије студијски програм Фитомедицина-Ентомологија и завршила 2012. год. са просечном оценом 9,71. Исте године је уписала докторске студије на одсеку Ентомологија, и положила све испите са просечном оценом 10,00.

Професионално кретање М.Sc. Дубравке Пудар је почев од основних студија било усмерено ка ентомологији са нагласком на медицинску и ветеринарску ентомологију. Тако је у оквиру поменуте области освојила Прву награду на међународном такмичењу студентских научно-истраживачких радова на Пољопривредном факултету у Новом Саду; а потом и Изузетну награду за израђени темат. Такође је остварила запажен успех на студентском међународном представљању научно-истраживачких радова у Будимпешти, Мађарска.

Након уписа мастер студија, а потом и докторских студија (односно у периоду од 2011. до 2018. године) М.Sc. Дубравка Пудар је била ангажована као демонстратор (волентер) на извођењу практичне наставе на основним академским студијама из неколико предмета из области Ентомологије, као и у одржавању теоријске наставе и извођењу предавања специфичне научне проблематике из области Медицинске ентомологије (како студентима основних и мастер студија, тако и колегама из сродних научних области).

М.Sc. Дубравка Пудар се активно бави и научно-истраживачким радом и првенствено је усмерена на проучавање и мониторинг различитих хематофагних инсеката. Као стипендиста Erasmus Mundus- JoinEU See програма за академску размену (подржаног од стране Европске уније) током 2013.-2014. год. провела је 10 месеци у Centro Agricoltura Ambiente “G. Nicoli” – САА – Департман за медицинску и ветеринарску ентомологију, Crevalcore, Болоња, Италија, где се интензивно бавила научним радом, првенствено из области оптимизације Технике стерилизације инсеката (SIT) на *Aedes albopictus*. У циљу унапређења свог знања и усавршавања вештина из области Медицинске и ветеринарске ентомологије, М.Sc. Дубравка Пудар је реализовала и неколико краткорочних научних мисија и тренинг курсева у еминентним научним центрима широм Европе. Такође је учествовала у реализацији активности у оквиру великог броја домаћих и страних пројеката.

М.Sc. Дубравка Пудар је аутор и коаутор девет публикација штампаних у целости или у изводу, а резултате свог рада представила је на шест научних скупова.

Течно говори, чита и пише енглески језик.