



Uppsala 2015-10-27

Redovisning 2015

Plan för minskning av Vectobac G inom Nedre Dalälven, till förmån för andra metoder



Hona och hane av översvämningsmyggan *Aedes sticticus*. Foto: Thomas Z. Persson Vinnersten.

Jan O. Lundström

Biologisk Myggkontroll inom NEDAB

Sammanfattning

De outhärdliga problemen med översvämningsmyggan *Aedes sticticus* inom sju kommuner vid Nedre Dalälven har sedan 2002 kunnat hanteras genom professionell bekämpning med det biologiska bekämpningsmedlet Bti. Bekämpningen är riktad mot stickmyggans larver och utförs genom spridning av produkten Vectobac G (Bti fäst vid korn av cellulosa) från helikopter. Naturvårdsverket har som villkor i bekämpningstillståndet för 2015 begärt redovisning av en plan för att på sikt fasa ut användningen av Vectobac G till förmån för annan metod. Problemet är att det i nuläget inte finns någon annan bekämpningsmetod som har motsvarande effektivitet som Vectobac G vilket krävs för att åstadkomma tillräcklig kontroll av *Aedes sticticus*. Ett ljus i tunneln är att fyra nya bekämpningsmetoder mot specifika arter av stickmyggor har nått så långt att de håller på eller är på gång att testas i fältförsök. Bedömningen är att en metod av dessa, ”*Classical Sterile Insect Technique*” (Classical SIT) har stor potential att kunna anpassas för specifik, effektiv, miljöneutral och långsiktigt hållbar bekämpning av *Aedes sticticus*. Enligt tidsplanen så kan fältexperiment för ”*proof-of-concept*” genomföras 2019 och 2020 inom begränsade områden. Om detta faller väl ut så är det sedan möjligt att gradvis fasa ut användning av Vectobac G till förmån för Classical SIT som bekämpningsmetod mot *Aedes sticticus* vid Nedre Dalälven.

1. Naturvårdsverkets villkor

Naturvårdsverkets beslut om dispens för spridning av Vectobac G från helikopter och inom Natura 2000-områden innehåller villkor om att ”till Naturvårdsverket och berörda tillsynsmyndigheter redovisa en plan för minskning av användandet av VectoBac G inom Nedre Dalälven, till förmån för andra metoder” (Janson & Ewing Skotnicka 2015).

2. Myggbekämpningens dilemma och vägen framåt

Bekämpning av stickmyggor och andra insekter har utförts under lång tid och med varierande framgång. Mänskligheten har genom upprepade misslyckanden fått lära sig att det inte finns någon enkel och billig bekämpningsmetod som fungerar tillräckligt bra mot stickmyggor. Vägen mot fungerande bekämpningsmetoder som inte orsakar skador på miljön har inneburit stora investeringar och enorma arbetsinsatser med forskning och utveckling. Mängder av kemiska, biologiska och mekaniska bekämpningsmetoder samt bekämpning genom miljöförändring har testats mot stickmyggor men få har fungerat. De viktigaste milstolparna vid utvecklingen av bekämpningsmetoder mot stickmyggor är upptäckten av det insekt-universella kontaktgiftet DDT och upptäckten av de stickmyggspecifika pre-toxinerna som finns hos jordbakterien *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti).

DDT som insektbekämpningsmedel upptäcktes 1939 av Paul Hermann Muller som 1948 fick Nobelpriset i Medicin/Fysiologi för sin upptäckt. Detta kontaktgift användes över hela världen mot i stort sett alla insekter som ansågs problematiska. Under 1950-talet användes DDT för effektiv bekämpning av de stickmyggor som sprider malaria och de stickmyggor som sprider dengue och gula febern. Bekämpning med DDT gav som bieffekt även en kraftig minskning av sandmyggor vilket minskade sjukdomar som spreds av dessa insekter. Under denna tid grundades en stark övertro på att bekämpning av stickmyggor och andra insekter var lätt och

okomplicerat – det var ett stort misstag. Rachel Carlson´s bok ”*Silent Spring*” (Carlson 1962), visade vilka omfattande negativa miljöeffekter som orsakades av DDT och andra kemiska bekämpningsmedel. När de negativa miljöeffekterna av DDT blev allmänt kända och stickmyggor och andra insekter dessutom utvecklade resistens mot DDT, så fasades användningen ut för att slutligen förbjudas i stora delar av världen. Efter ”*Silent Spring*” utvecklades krav på miljöuppföljning av bekämpningsmedel.

Bakterien *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) specifika toxicitet mot larver av stickmyggor upptäcktes 1976 av Joel Margalit. Experiment med larver av stickmyggor och andra insekter visade att Bti hade extrem specificitet mot stickmyggor, vilket var ett enormt framsteg på vägen mot effektiv och miljöneutral bekämpning av stickmyggor. De första stora fältförsöken med Bti utfördes i Tyskland under 1978 med gott resultat mot stickmygglarver och utan mätbara negativa effekter på andra insekter. En mängd studier av Bti´s effekter på olika arter av insekter och andra djur har genomförts och visar samstämmigt att bekämpning av stickmyggor kan utföras utan mätbara negativa effekter på andra organismer (Lundström & Schäfer 2015a). Upptäckten av Bti öppnade för första gången möjlighet att utföra storskalig, effektiv bekämpning av stickmyggor utan några mätbara negativa miljöeffekter. Under de senaste decennierna har därför användningen av Bti mot stickmyggor ökat och är nu den dominerande bekämpningsmetoden i Europa, Nordamerika och Australien.

Men problemen med att över huvud taget kunna bekämpa flera stickmyggarter som sprider livshotande infektioner har tvingat fram försök att ta fram nya bekämpningsmetoder och att anpassa existerande insektbekämpningsmetoder för användning mot arter av stickmyggor. Nedan beskrivs fyra lovande bekämpningsmetoder som kan anpassas för stickmyggor, exempelvis översvämningsmyggan *Aedes sticticus* (Figur 1).



Figur 1. Parningen hos översvämningsmyggan *Aedes sticticus* börjar flygande, men detta par landade på stövelspännet en stund innan de var klara. Foto Jan O. Lundström.

3. Fyra nya bekämpningsmetoder

Sterile Insect Technique (SIT) är en artspecifik och miljöneutral metod för bekämpning av insekter som bygger på utsättning av stora mängder sterila hanar (Knipling 1955, 1979, 1998, Krafsur 1998, Dyck et al., 2005). De sterila hanarna parar sig med de lokala honorna av arten vilket leder till kraftigt minskad reproduktion och om tillräckligt många sterila hanar sätts ut över en tillräcklig tidsrymd så elimineras eller minskas populationen kraftigt. Första exemplet på lyckad storskalig bekämpning med SIT är elimineringen av parasitflugan *Cochliomyia hominivorax* från USA, Mexico och Centralamerika, samt även från Libyen (Lindquist et al., 1992). Andra exempel är användningen av SIT för bekämpning av medelhavsfruktflugan *Ceratitis capitata* och andra arter av fruktflugor i USA, Centralamerika, Sydamerika, Sydafrika, Europa och Asien (Dyck et al., 2005), användningen av SIT mot fjärilen ”pink bollworm” *Pectinophora gossypiella* i USA och fjärilen ”codling moth” *Cydia pomonella* i Canada (Krafsur 1998, Tan 2000, Koyama et al., 2004, Vreysen et al.,

2007). Dessa bekämpningsprogram arbetar i väldigt omfattande skala med produktion på 2 000 000 000 sterila hanar av medelhavsfruktflugor per vecka i El Pinjo, Guatemala, vilket motsvara ca 20 ton fruktflugor per vecka.

Utvecklingen av SIT för artspecifik bekämpning av stickmyggor tog sin början 1955 och har varit föremål för flera omfattande vetenskapliga genomgångar som unisont kommer fram till att de tekniska förutsättningarna finns för bekämpning av ett flertal stickmyggorarter med SIT (Dame et al., 2009, Benedict & Robinson 2003, Klassen & Curtis 2005, Alphey et al., 2010, Atkinson et al., 2007). Ett lyckat exempel är bekämpningen av *Anopheles albimanus* i El Salvador (Lofgren et al., 1974; Weidhaas DE, et al 1974, Benedict & Robinson 2003), men trots att bekämpningen med hjälp av SIT så småningom fungerade utomordentligt väl så medförde finansiella problem under det eskalerande inbördeskriget i El Salvador att SIT projektet lades ner (Black et al., 2011). Att inte utvecklingen av SIT mot arter av stickmyggor har fortsatt beror enligt Black et al. (2011) på en fatal sammanblandning mellan SIT och en annan metod vad gäller

effekter på hanarnas fitness, vilket under en lång tid sänkte förtroendet för SIT mot stickmyggor.

Fungerande Classical SIT kräver industriell odling av målarten i mycket stor mängd, utsortering av hanpuppor, sterilisering av hanar i puppstadiet utan att minska deras sexdrive, samt utplacering av sterila hanar så att de lätt får tillgång till de lokala honorna för parning. International Atomic Energy Agency (IAEA), som på medlemsländernas uppdrag arbetar med att anpassa Classical SIT för bekämpning av stickmyggor, förordar sterilisering av hanpuppor med röntgenstrålning då metoden fungerar bra att optimera mot sexdrive och dessutom är säker och kan kommuniceras väl med befolkningen. Mygg SIT-projekten inom IAEA fokuseras på fyra arter stickmyggor som är vektorer; *Aedes aegypti* och *Aedes albopictus* som sprider denguevirus, chikungunyavirus och gula febern virus, samt *Anopheles gambiae* och *Anopheles arabiensis* som sprider malaria.

Incompatible Insect Technique (IIT) är en artspecifik bekämpningsmetod som bygger på infektion med bakterien *Wolbachia* (Zhang et al., 2015). Denna obligat intracellulära parasit hos insekter sprids från infekterad hona till hennes avkomma (döttrar) och kan hindra äggens befruktning (Werren 1997, Bourtzis & O'Neill 1998, Stouthammer et al., 1999, Stevens et al., 2001, Bourtzis & Miller 2003). Första fyndet av *Wolbachia pipientis* är från ovarier hos stickmyggan *Culex pipiens* (Hertig 1936), men fortsatta studier visar att denna bakterie förekommer hos mängder av insekter, isopoder och kvalster (Werren 1997, Werren & O'Neill 1997, Bourtzis & O'Neill 1998, Stouthammer et al., 1999, Stevens et al., 2001, Bourtzis & Miller 2003). *Wolbachia* bildar olika stammar och cytoplasmisk inkompatibilitet uppkommer när en *Wolbachia*-infekterad hane parar sig med en oinfekterad hona, eller när hane och hona som bär på olika *Wolbachia*-stammar parar sig, och i båda fallen medför detta att embryot dör i ägget (Bourtzis 2007). Detta innebär att *Wolbachia* kan användas för bekämpning av stickmyggor på liknande sätt som SIT, men med den skillnaden att man introducerar en främmande bakterie i stickmyggpopulationen. Metoden med spridning av *Wolbachia* för bekämpning av stick-

myggor är mycket lovande, men det finns också en del kritik mot att introducera en ny variant av *Wolbachia* i en insektpopulation. Det finns indikationer på att *Wolbachia*-infektion hos stickmyggor kan minska vektor-kompetensen för dengue virus (Dodson et al., 2014), men öka vektorkompetensen för West Nile virus (Walker et al., 2015), vilket innebär en svårbedömd risk vid användning i stor skala. Det är dessutom inte känt hur *Wolbachia* sprids mellan arter av insekter och när man introducerar en *Wolbachia*-stam i en insektpopulation så finns det ingen möjlighet att reversera utvecklingen och få bort denna ur populationen.

Release of insects carrying dominant lethals (RIDL) (Thomas et al., 2000) är en vidareutveckling av ”female killing” (FK) som togs fram redan 1967 (Curtis 1967). Oxitech Ltd, ett företag från Oxford University, har tagit fram genetiskt designade stammar av både *Aedes aegypti* och *Aedes albopictus* där en cytotoxisk gen i honans fettkropp aktiveras om inte hon som larv får i sig tetracyklin i dieten (Alphey & Andreade 2002). Fettkroppen har avgörande betydelse för att processa och lagra näring och syntetiserar dessutom viktiga komponenter för stickmyggans immunsystem. Det innebär att RIDL-larver utvecklas normalt till både hanar och honor om de får tetracyklin i larvdieten, men om larverna får normal diet utan tetracyklin kommer samtliga honor att dö innan de blir vuxna insekter. RIDL för bekämpning av exempelvis *Aedes aegypti* innebär att hanar av den genetiskt designade stammen, som bär på anlaget för tetracyclin-behov, släpps ut och parar sig med honor av den lokala populationen. Dessa honor kommer lägga ägg som kläcks till larver, men alla honor i den nya generationen dör utan tetracyklin så endast hanar blir kvar. Upprepade utsläpp av RIDL hanar leder till att den lokala populationen utsläcks eller minskar kraftigt. RIDL är en väldigt spännande ny bekämpningsmetod med stor potential, men dels kan det bli komplicerat att försvara utsläpp av genetiskt modifierade (GMO) stickmyggor, dels riskerar metoden att bli mycket kostsam då Oxitech patenterar de framtagna RIDL-stammarna av olika arter stickmyggor för kommersialisering.

RNA Guided Gene Drives handlar om själviska gener som potentiell bekämpningsmetod mot insekter och föreslogs initialt av Austin Burt för ett decennium sedan (Burt 2003). Naturligt förekommande själviska gener har ökade odds att spridas vidare till nästa generation och denna fördel gör att de sprids även om de reducerar individens fitness (Burt & Trivers 2009). Några exempel är gener för endonukleaser som kan kopiera sig in i kromosomer där de inte borde finnas (Burt & Koufopanou 2004), delningsförskjutare som förstör konkurrerande kromosomer under meiosen (Lyttle 1991), transposomer som placerar in kopior av sig själva på andra håll i genomet (Charlesworth & Langley 1989), medea element som gör sig av med konkurrerande syskon som inte ärver dessa element (Beeman et al., 1992, Chen et al., 2007) och även mikrober liksom *Wolbachia* som ärvs från mor till dotter (Werren 1997).

För ett par år sedan tog denna forskning ett kraftigt skutt framåt när enzymet Cas9 upptäcktes och anpassades för att utföra kirurgiska ingrepp i DNA sekvenser genom att guidas av en RNA-molekyl (Deltcheva et al., 2011, Jinek et al., 2012). Metoden med CRISPR-Cas9 teknologi är så kraftfull och anpassningsbar att **RNA Guided Gene Drives** troligen kommer att kunna användas för att omforma arvsmassan hos flertalet sexuellt reproducerande organismer i framtiden och har även stor potential för bekämpning av stickmyggor (Esvelt et al 2014). Men det finns många orsaker att vara försiktig med denna teknologi eftersom det finns risk för potentiellt omfattande miljöpåverkan och även är svårt med andra säkerhetsbedömningar i nuläget (Oye et al 2014).

Slutsatsen efter genomgång av för och nackdelar med dessa nya bekämpningsmetoder som håller på att utvecklas mot stickmyggor är att samtliga fyra metoder har potential att vara mycket effektiva mot arter av stickmyggor, men att tre av metoderna innebär ekologiska risker och miljörisker som kan vara svåra eller mycket svåra att hantera. I nuläget är det nog enbart metoden med Classical SIT som uppfyller

rimliga krav på både effektivitet och miljöneutralitet. Fortsättningsvis beskrivs hur Classical SIT kan anpassas och implementeras för bekämpning *Aedes sticticus*, vilket på sikt innebär att användningen av Vectobac G i områden vid Nedre Dalälven kan fasas ut till fördel för Classical SIT.

4. Strategiska mål för effektiv, miljöneutral och långsiktig bekämpning

1. Anpassning/utveckling av Classical SIT för bekämpning av översvämningsmyggan *Aedes sticticus* i lämpligt studieområde så ”*proof-of-concept*” kan erhållas.
2. Gradvis övergång till Classical SIT som bekämpningsmetod mot *Aedes sticticus* och motsvarande utfasning av Vectobac G.

5. Arbetsplan för SIT ”*proof-of-concept*” mot *Aedes sticticus*

Bekämpning genom introduktion av sterila hanar enligt Classical SIT bygger på att man etablerar en laboratoriekoloni av *Aedes sticticus*, odlar den i mycket stort antal, sorterar ut hanpupper som steriliseras med fotoner (röntgen) och släpper ut stora mängder steriliserade hanar som parar sig med honor från den vilda population man vill bekämpa. De honor som parat sig med en steril hane kommer då att lägga ägg som inte kläcks till larver vilket leder till utsläckning av den lokala populationen. Classical SIT fungerar bättre ju färre stickmyggor som finns kvar inom den lokala populationen och kan vara svår att använda på en art som förekommer i väldigt stort antal. Experter inom IAEA betonar att Classical SIT med fördel kan kombineras med andra bekämpningsmetoder. Förslagsvis bör vi reducera den lokala populationen av *Aedes sticticus* till en mycket låg nivå genom bekämpning med Vectobac G och då sätta in Classical SIT.



Figur 2. Tidsplan för framtagning/anpassning av Classical SIT mot *Aedes sticticus* från design av industriell odlingsanläggning fram till genomförande av test för ”proof-of-concept” inom lämpligt studieområde under 2019 och 2020.

De stora utmaningarna blir att anpassa befintliga metoder och även utveckla vissa nya metoder för storskalig industriell odling, sterilisering, transport och frisläppande av steriliserade hanar av stickmyggor så att dessa lyckas konkurrera om honorna i målpopulationen (Dame et al., 2009).

Myggproduktionsanläggning (Figur 2). De senaste årets samarbete med IAEA i Wien, Mahidol University i Bangkok och internationellt erkända experter från andra institut i ett tiotal länder, har gett en mycket bra grund för design av anläggning för produktion av tiotals till hundratals miljoner sterila hanmyggor per vecka. Liknade anläggningar finns för produktion av sterila hanar av fruktflugor – den största producerar 2 000 000 000 sterila hanar i veckan (ca 20 ton/vecka) och det finns ytterligare ett tiotal anläggningar som producerar några hundratals miljoner sterila hanar per vecka. Ännu har inte motsvarande storlek odlingsanläggningar för

stickmyggor etablerats, men flera länder planerar för detta.

Myggproduktion (Figur 2). Väl beprövade metoder för produktion av miljontals stickmyggor per dag finns för några arter av släktena *Aedes*, *Culex* och *Anopheles* (Ansari et al., 1977, Bailey et al., 1980, Sigh et al., 1975). För produktion av sterila hanar behövs två produktionslinjer; en för produktion av ägg och en för produktion av de hanpupper som skall steriliseras. Produktionsmetoderna behöver såklart anpassas och optimeras för den specifika arten. Ägg från översvämningsmyggan *Aedes sticticus* har lång överlevnad vilket innebär stora fördelar i samordningen mellan de två produktionslinjerna. Behovet av att på kort tid producera, sterilisera och sätta ut stora mängder hanar är dock en utmaning. För att kunna realisera tidsplanen behövs att en koloni av *Aedes sticticus* från Nedre Dalälven etableras under sommaren 2016.



Figur 3. Hallstjärnen vid Huddunge by svämmar över efter kraftiga regn, men har normalt ingen synbar vattenyta. Här produceras mycket stora mängder *Aedes sticticus*. Foto Jan O. Lundström.

Sterilisering av hanar (Figur 2). Sterilisering av stickmygghanar kan utföras med partikelstrålning, fotoner eller på kemisk väg. Kemisk sterilisering har flera fördelar exempelvis vad gäller minskad risk för somatiska skador (Helinski et al., 2009), men kan innebära en något ökad miljörisk (Bracken & Dondale 1972, Sharma 1976). Sterilisering med partikelstrålning innebär omfattande säkerhetsproblem då det kräver tillgång till och arbete med klassade ämnen, vilket också inverkar på kostnader. Sterilisering med fotoner (röntgen) är den metod som förordas av expertpanelen hos IAEA och som planeras för användning vid framtagning av SIT för bekämpning av *Aedes sticticus* vid Nedre Dalälven. Så snart det finns en koloni av *Aedes sticticus* behövs därför att optimal dosering av röntgenstrålning utprovas så att en mycket hög andel av hanarna steriliseras utan att för den skull förlora i parningsförmåga.

Transport & frisläppande av hanar (Figur 2). För flertalet stickmyggararter som planeras för bekämpning med hjälp av SIT så sker en relativt kontinuerlig förökning under stor del av året, vilket innebär behov av ofta återkommande

utsättning av sterila hanar så de parar sig med de många generationerna av nyckläkta honor. Relativt enkla metoder för hantering, transport och frisläppande av steriliserade stickmygghanar har vanligen fungerat väl för sådana arter (Bailey et al., 1979). Översvämningsmyggan *Aedes sticticus* har strikt avgränsade perioder då larver kläcker fram och utvecklas, samt strikta parningsperioder i samband med att de vuxna hanarna och honorna börjar flyga. Det innebär att det går att beräkna med hög säkerhet när sterila hanar behöver sättas ut för att paras med lokala honor och för *Aedes sticticus* behövs utsättningar av hanar endast i samband med de översvämningsperioder som inträffar under perioden maj till augusti.

Fältförsök (Figur 2). Innan SIT är redo att användas i full skala behövs ”proof-of-concept” i fältförsök där sterila hanar av *Aedes sticticus* sätts ut för provbekämpning under liknande förhållande som i de områden där metoden planeras användas vid skarp bekämpning. Vi har identifierat lämpligt fältstudieområde vid Huddunge där två torrlagda men översvämningsbenägna sjöar, Hallstjärnen och Karbosjön, producerar de mycket stora mängder *Aedes*

sticticus som drabbar befolkningen (Figur 3). Totalt handlar det om 150 ha temporärt översvämmade områden där vi sedan 2005 utför bekämpning med Vectobac G. Våra historiska data över larvmängder och mängden vuxna myggor ger en solid bakgrund för utvärdering av insatser med Classical SIT mot *Aedes sticticus*. Enligt tidsplanen så kan fältexperiment för ”proof-of-concept” genomföras i detta område sommaren 2019 och sommaren 2020 (Figur 2).

Bekämpning med hjälp av Classical SIT kan kostnads- effektiviseras genom att initialt kombineras med en annan bekämpningsmetod och erfarenhetsmässigt så krävs detta nästan undantagslöst (Knipling 1979, Dame et al., 2009). *Aedes sticticus* produceras i enorma mängder vid översvämning och det är knappast möjligt att odla och placera ut de mängder av sterila hanar som krävs för bekämpning med enbart Classical SIT. Genom initial bekämpning med Vectobac G (som redan sker) så reduceras den effektiva population till en mycket lägre nivå som med hög sannolikhet kan bekämpas effektivt med Classical SIT. Bekämpningseffekten kan utläsas av att färre larver och därmed färre stickmyggor kommer från översvämmade ytor. Eftersom Classical SIT blir mer effektiv ju färre stickmyggor som finns kvar av den lokala populationen, så kommer detta över tiden att leda till lokal utsläckning av *Aedes sticticus* populationen i behandlade områden.

Den förväntade effekten av att använda Classical SIT mot *Aedes sticticus* i de två produktionsområdena vid Huddunge är att inga larver påträffas vid översvämning och inga vuxna honor fångas i fällorna som sätts ut i området. När väl etablerad och fungerande så ger Classical SIT ett fullgott skydd mot *Aedes sticticus* vilket innebär en möjlighet till gradvis utfasning av det biologiska bekämpningsmedlet Vectobac G som för närvarande är den enda fungerande bekämpningsmetoden (Lundström & Schäfer 2015b).

6. Refererad litteratur

- Alphey L, Andreassen MH. 2002. Dominant lethality and insect population control. *Molecular and Biochemical Parasitology* 121: 173-178.
- Alphey L, Benedict M, Bellini R, Clark GG, Dame DA, Service MW, Dobson SL. 2010. Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases. An analysis. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 10: 295-311.
- Ansari MA, Sigh KRP, Brooks GD, Malhotra P, Vaidyanathan V. 1977. The development of procedures for mass rearing of *Aedes aegypti*. *Indian Journal of Medical Research* 65: 91-99.
- Atkinson MP, Su Z, Alphey N, Alphey LS, Coleman PG, Wein LM. 2007. Analyzing the control of mosquito-borne diseases by a dominant lethal genetic system. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 104: 9540-9545.
- Bailey DL, Lowe RE, Dame DA, Seawright JA. 1980. Mass rearing the genetically altered MACHO strain of *Anopheles albimanus* Wiedemann. *American Journal of Tropical medicine and Hygiene* 29: 141-149.
- Bailey DL, Lowe RE, Fowler JEF, Dame DA. 1979. Sterilizing an packaging males of *Anopheles albimanus* Wiedemann for field release. *American Journal of Tropical medicine and Hygiene* 28: 902-908.
- Benedict M, Robinson A. 2003. The first release of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. *Trends in Parasitology* 19: 349-355.
- Black WC, Alphey L, James AA. 2011. Why RIDL is not SIT. *Trends in Parasitology* 27: 362-370.
- Beeman RW, Friesen KS, Denell RE. 1992. Maternal-effect selfish genes in flour beetles. *Science* 256: 89-92.
- Bourtzis K. 2007. Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility to control insect pests? In Vreysen et al. (Eds). *Area-Wide Control of Insect Pests: from research to field implementation*. Joint FAO/IAEA Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Vienna, Austria. Dordrecht, The Netherlands, Springer.
- Bourtzis K, Miller TA (Eds). 2003. *Insect symbionts*. CRC Press, Florida, USA.

- Bourtzis K, O'Neill SL. 1998. *Wolbachia* infections and their influence on arthropod reproduction. Bioscience 48: 287-293.
- Burt A. 2003. Site-specific selfish genes as tools for the control and genetic engineering of natural populations. Proceedings of the Biological Sciences B 270: 921-928.
- Burt A, Koufopanou V. 2004. Homing endonuclease genes: the rise and fall and rise again of a selfish element. Current Opinion in Genetics & Development 14: 609-615.
- Burt A, Trivers R. 2009. Genes in conflict: the biology of selfish genetic elements. Harward University Press.
- Carlson R. 1962. Silent spring.
- Charlesworth B, Langley CH. 1989. The population genetics of *Drosophila* transposable elements. Annual Review of Genetics 23: 251-287.
- Chen C-H, Huang H, Ward CM, Su JT, Schaeffer LV, Guo M, Hay BA. 2007. A synthetic maternal-effect selfish genetic element drives population replacement in *Drosophila*. Science 316: 597-600.
- Curtis CF. 1967. A possible genetic method for control of *Glossinia*. Bulletin of Entomological Research 57: 509-523.
- Dame DA, Curtis CF, Benedict MQ, Robinson AS, Knols BGJ. 2009. Historical applications of induced sterilization in field populations of mosquitoes. Malaria Journal 8: (Supplement 2) S2.
- Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E. 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. Nature 471: 602-607.
- Dodson BL, Hughes GL, Oluwatobi P, Matarachiero AC, Kramer LD, Rasgon JL. *Wolbachia* enhances West Nile virus (WNV) infection in the mosquito *Culex tarsalis*. PloS Neglected Tropical Diseases 8(7): e2965 (DOI: 10.1371/journal.pntd.0002965).
- Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS (Eds). 2005. Sterile insect technique: Principle and practice in area wide integrated pest management. Dordrecht, the Netherlands, Springer.
- Esvelt KM, Smidler AL, Catteruccia F, Church GM. 2014. Emerging technology: Concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations. eLife 2014;3:e03401. (DOI: 10.7554/eLife.03401).
- Helinski ME, Parker AG, Knols BG. 2009. Radiation biology of mosquitoes. Malaria Journal 8 (Suppl 1): S5.
- Hertig M. 1936. The rickettsia, *Wolbachia pipientis* and associated inclusions of the mosquito, *Culex pipiens*. Parasitology 28: 453-490.
- Janson R, Ewing Skotnicka G. 2015. Ansökan om Natura 2000-tillstånd samt dispens från förbudet att sprida biocidprodukter från luftfartyg för bekämpning av larver av översvämningsmygg under 2015 i översvämningsområden vid Nedre Dalälven. Naturvårdsverkets beslut 2015-04-28 i ärende nummer NV-08038-14.
- Jinek M, Chylinski F, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 337: 816-821.
- Klassen W, Curtis CF. 2005. History of the sterile insect technique. In Sterile insect technique: Principle and practice in area wide integrated pest management (Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS Eds), Springer.
- Knipling E. 1955. Possibilities of insect control or eradication through use of sexually sterile males. Journal of Economic Entomology 48: 459-462.
- Knipling E. 1979. Agriculture Handbook No 512: The basic principles of insect population suppression and management. Washington DC, USDA.
- Knipling E. 1998. Role of parasitoid augmentation and sterile insect techniques for area-wide management of agricultural insect pests. Journal of Agricultural Entomology 15: 273-301.
- Koyama J, Kakainohana H, Miyatake T. 2004. Eradication of the melon fly *Bactrocera cucurbitae* in Japan: importance of behaviour, ecology, genetics and evolution. Annual Review of Entomology 49: 331-349.
- Krafsur ES. 1998. Sterile insect technique for suppressing and eradicating insect populations: 55 years and counting. Journal of Agricultural Entomology 15: 303-317.
- Lindquist DA, Abusowa M, Hall MJ. 1992. The new world screwworm fly in Libya. A review of its introduction and eradication. Medical and Veterinary Entomology 6: 2-8.
- Lofgren CS, Dame DA, Breeland SG, Weidhaas DE, et al. 1974. Release of chemosterilized males for the control of *Anopheles albimanus* in el

- Salvador. III. Field methods and population control. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 23: 288-297.
- Lundström JO, Schäfer M. 2015a. MKB 2015 – användning av Vectobac G med spridning från helikopter för bekämpning av stickmygglarver i översvåmningsområden vid nedre Dalälven.
- Lundström JO, Schäfer M. 2015b. Redovisning 2015 - Alternativa bekämpningsåtgärder under bekämpningssäsongen 2015 i nedre Dalälven och sammanställning av information om effekter av skötselåtgärder som bete och slåtter i älvängar.
- Lyttle TW. 1991. Segregation distorters. Annual Review of Genetics 25: 511-557.
- Oye KA, Esvelt K, Appleton E, Catteruccia F, Church G, Kuiken T, Bar-Yam Lightfoot S, McNamara J, Smidler A, Collins JP. 2014. Regulating gene drives. Science Insights Perspectives 345: Issue 6197. (DOI: 10.1126/science.1254287).
- Sharma VP. 1976. Elimination of aziridine residues from chemosterilized mosquitoes. Nature 261: 135
- Sigh KRP, Patterson RS, LaBrecque GC, Razdan RK. 1975. Mass rearing of *Culex pipiens fatigans* Wiede. Journal of Communicable Diseases 7: 31-53.
- Stevens L, Giordano R, Fialho RF. 2001. Male-killing, nematode infections, bacteriophage infection, and virulence of cytoplasmic bacteria in the genus *Wolbachia*. Annual Review of Ecological Systems 32: 519-545.
- Stouthammer R, Breeuwer JAJ, Hurst GD. 1999. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. Annual Review of Microbiology 53: 71-102.
- Tan HK (Eds). 2000. Area-wide control of fruit flies and other insect pests. International Conference on Area-Wide Control of Insect Pests, and the 5th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance. 28 May - 5 June 1998, Penang, Malaysia. Penerbit Universiti Sains Malaysia, Pulau Pinang, Malaysian.
- Thomas DD, Donnelly CA, Wood RJ, Alphey LS. 2000. Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. Science 287: 2474-2476.
- Vreysen MJB, Robinson AS, Hendrichs J (Eds). 2007. Area-Wide Control of Insect Pests: from research to field implementation. Joint FAO/IAEA Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Vienna, Austria. Dordrecht, The Netherlands, Springer.
- Walker T, Johnson PH, Moreira LA, Irtube-Ormaetxe I, Frentiu FD, McMeniman CJ, Leong YS, Dong Y, Axford J, Kriesner P, Lloyd AL, Ritchie SA, O'Neill SL, Hoffmann AA. 2015. The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. Nature 476: 450-455.
- Werren JH. 1997. Biology of *Wolbachia*. Annual Review of Entomology 42: 587-609.
- Werren JH, O'Neill SL. 1997. The evolution of heritable symbionts, pp 1-41 in O'Neill SL, Hoffmann AA, Werren JH (Eds). *Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Weidhaas DE, et al 1974. Release of chemosterilized males for control of *Anopheles albimanus* in El Salvador. 4. Dynamics of the test population. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 23: 298-308.
- Zhang D, Zheng X, Xi Z, Bourtzis K, Gilles JRL. 2015. Combining the sterile insect techniques with the incompatible insect technique: I Impact of *Wolbachia* infection on the fitness of triple- and double-infected strains of *Aedes albopictus*. PLoS One. April 7 (DOI 10.1371/journal.pone.0121126).