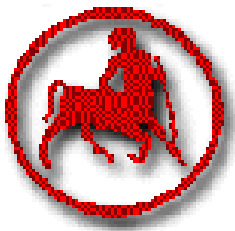
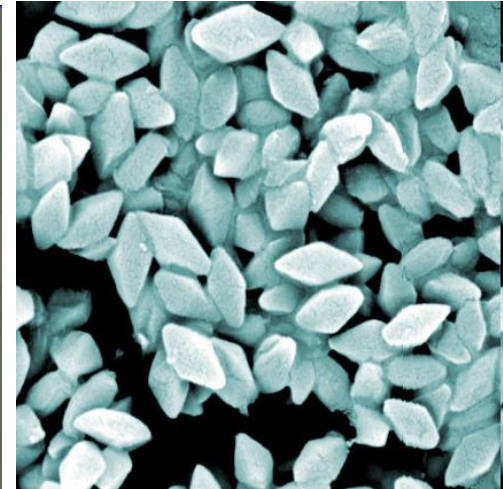


Διάλεξη 8

Εφαρμογές Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας στην Γεωργία
Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα Βιολογικής Προέλευσης



Εφαρμογές Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας στην Γεωργία

- 1. Φυτοπροστατευτικά προϊόντα βιολογικής
προέλευσης**
- 2. Ενισχυτικά φυτικής ανάπτυξης – βιολογικά λιπάσματα**



Φυτοπροστατευτικά προϊόντα βιολογικής προέλευσης

Φυτοπροστατευτικά προϊόντα στα οποία η δραστική ουσία είναι

- 1. Μικροοργανισμοί** που έχουν την δυνατότητα να σκοτώνουν έντομα, φυτά ή άλλους μικροοργανισμούς
- 2. Φυσικά προϊόντα, ουσίες και εκχυλίσματα** που παράγονται από μικροοργανισμούς ή φυτά και έχουν βιοκτόνο δράση



Γιατί είναι επιθυμητή η χρήση τους;

- Οδηγούν σε περιορισμό της χρήσης συνθετικών γεωργικών φαρμάκων που έχει αποδειχθεί ότι δημιουργούν περιβαλλοντικά προβλήματα αλλά και προβλήματα υγείας
 - α) συσσωρεύονται στην τροφική αλυσίδα (DDT)
 - β) παρουσιάζουν υψηλή τοξικότητα στο άνθρωπο (aldicarb),
 - γ) παρεμποδίζουν την ομαλή λειτουργία του ορμονικού συστήματος ανώτερων ζωικών οργανισμών (vinclozolin),
 - δ) προκαλούν καρκινογένεση και μεταλαξιγένεση



Φυτοπροστατευτικά προϊόντα βιολογικής προέλευσης

- Καταλαμβάνουν περίπου **1.3%** της παγκόσμιας αγοράς με τα βιολογικά εντομοκτόνα να καταλαμβάνουν **το 4-5% της αγοράς εντομοκτόνων**
- Η εισαγωγή ευνοϊκών νομοθετικών ρυθμίσεων για τα βιολογικά σκευάσματα οδήγησε εταιρείες αγροχημικών να επενδύσουν περισσότερο στην παραγωγή τους
- **Για να εκδοθεί άδεια χρήσης για ένα συνθετικό γεωργικό φάρμακο απαιτούνται περίπου 36-45 μήνες ενώ το αντίστοιχο χρονικό διάστημα για ένα βιολογικό σκεύασμα είναι 12 μήνες**

Κατηγορίες φυτοπροστατευτικών προϊόντων βιολογικής προέλευσης

Τα βιολογικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα ανάλογα με το είδος του οργανισμού - στόχου κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες:

- **Βιολογικά Εντομοκτόνα**
- Βιολογικά Μυκητοκτόνα
- Βιολογικά Ζιζανιοκτόνα



Βιολογικά Εντομοκτόνα

Τα βιολογικά εντομοκτόνα έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια σε σημαντικό βαθμό ιδιαίτερα με την βοήθεια της γενετικής μηχανικής που βοήθησε στην βελτίωση των χαρακτηριστικών τους



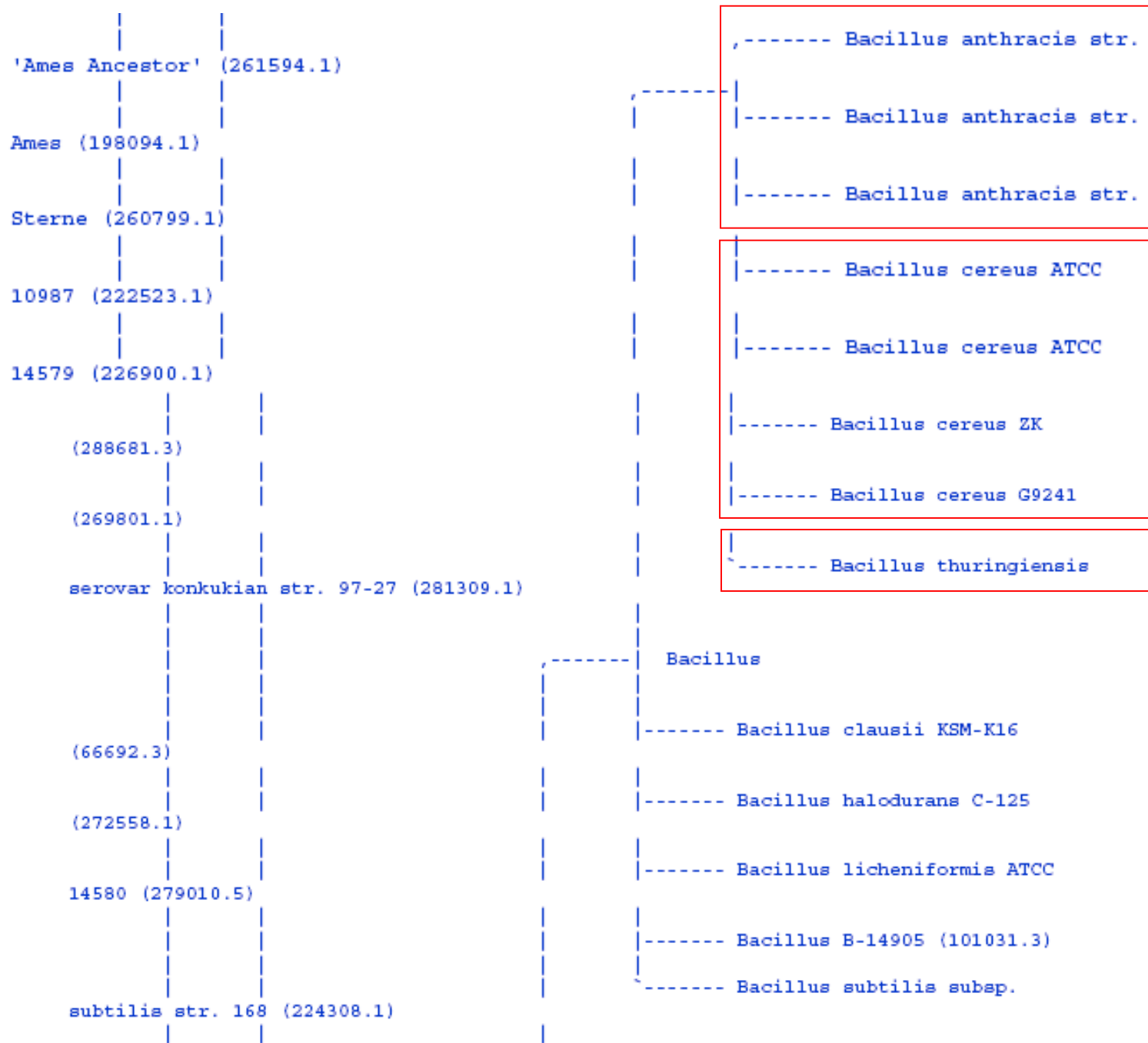
Βιολογικά Εντομοκτόνα

1. *Bacillus thuringiensis*
2. Βακιλοϊοί (*Baculoviruses*)
3. Εντομοπαθογόνοι μύκητες
4. Εντομοπαθογόνοι νηματώδεις



Bacillus thuringiensis (Bt)

- Απομονώθηκε από προνύμφες σε αποθηκευμένο αλεύρι το 1911 στην περιοχή της Θουριγγίας, Γερμανία
- Βακτήρια του είδους *B. thuringiensis* είναι συγγενικά με τα είδη *B. anthracis* , *B. cereus*
- Το ***B. anthracis*** είναι υπεύθυνο για την πρόκληση της ασθένειας του άνθρακα
- Το ***B. cereus*** είναι βακτήριο εδάφους και τροφίμων και προκαλεί διάρροια και στομαχικές διαταραχές

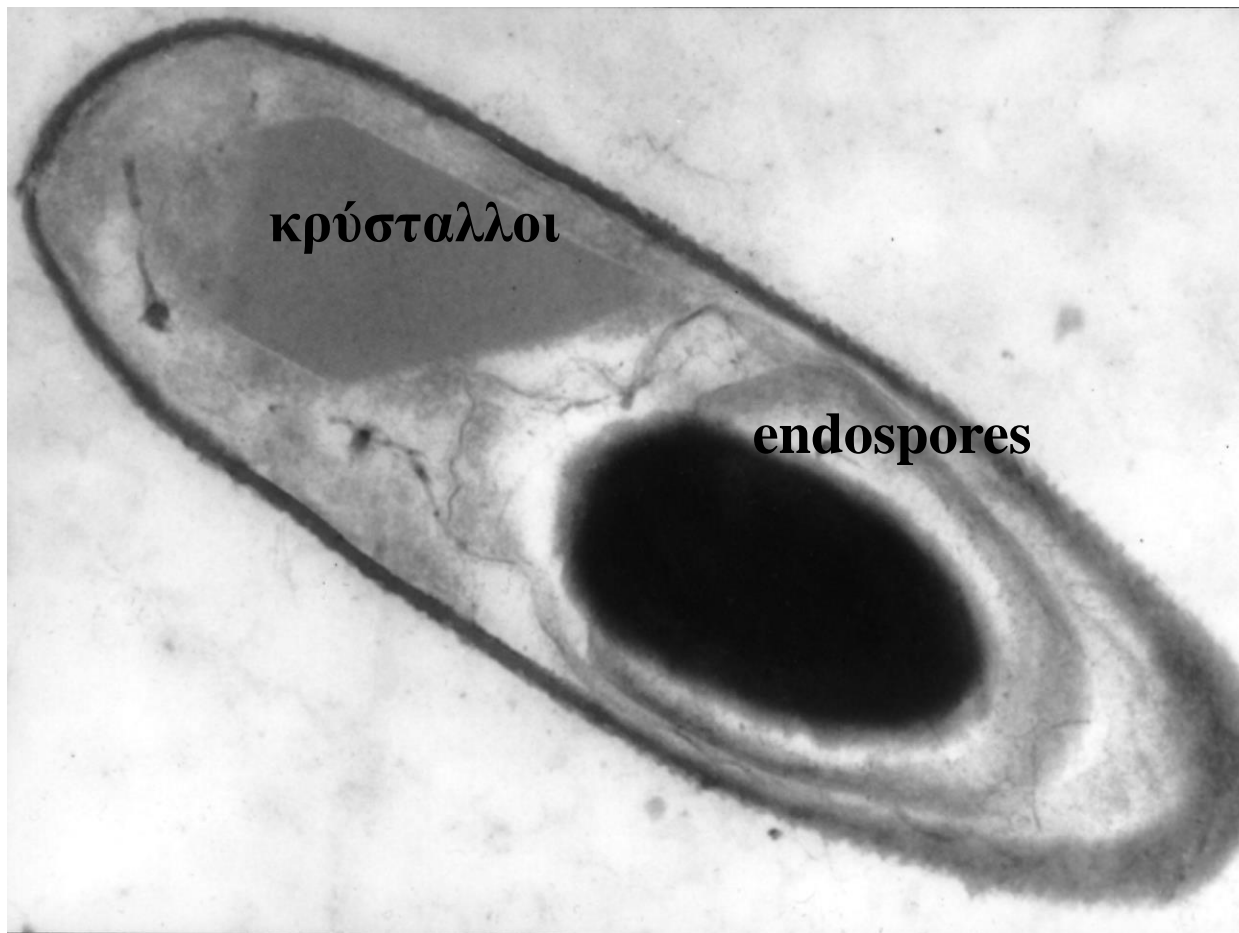


Bacillus thuringiensis Εντομοκτόνα

Η εντομοκτόνος δράση στελεχών του είδους *B. thuringiensis* οφείλεται στην ικανότητα τους να παράγουν κρυστάλλους που περιέχουν μια τοξίνη, την **δ-ενδοτοξίνη**

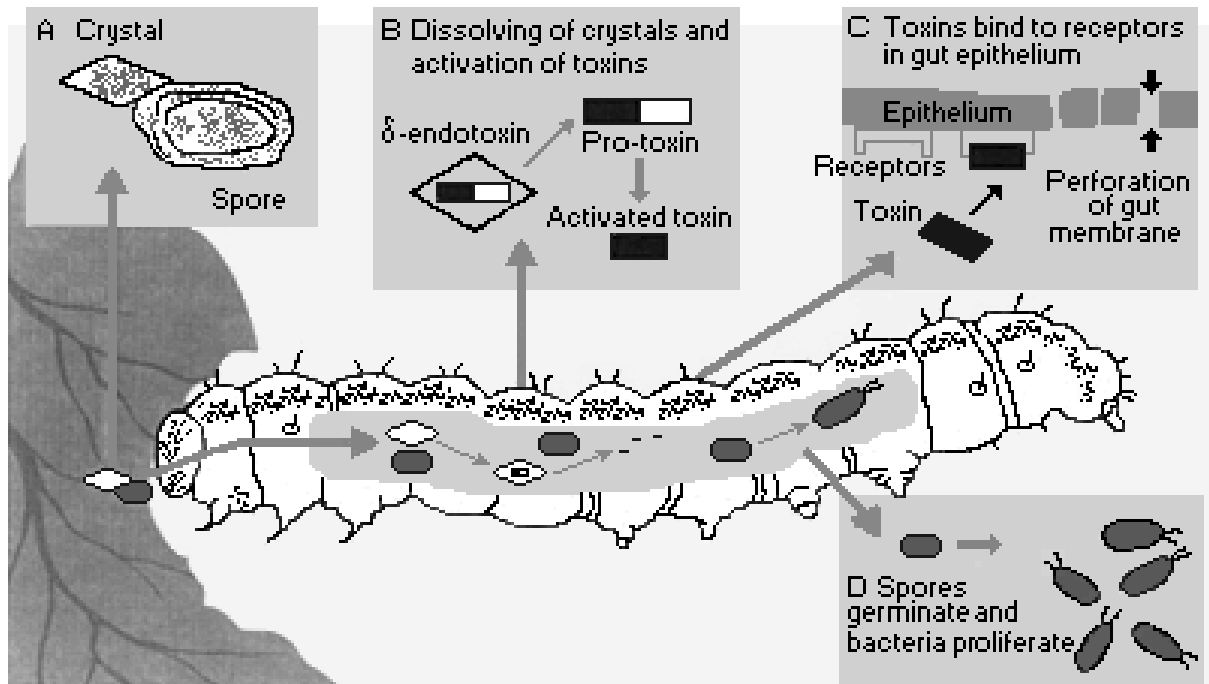


Κρύσταλλοι δ-ενδοτοξίνης



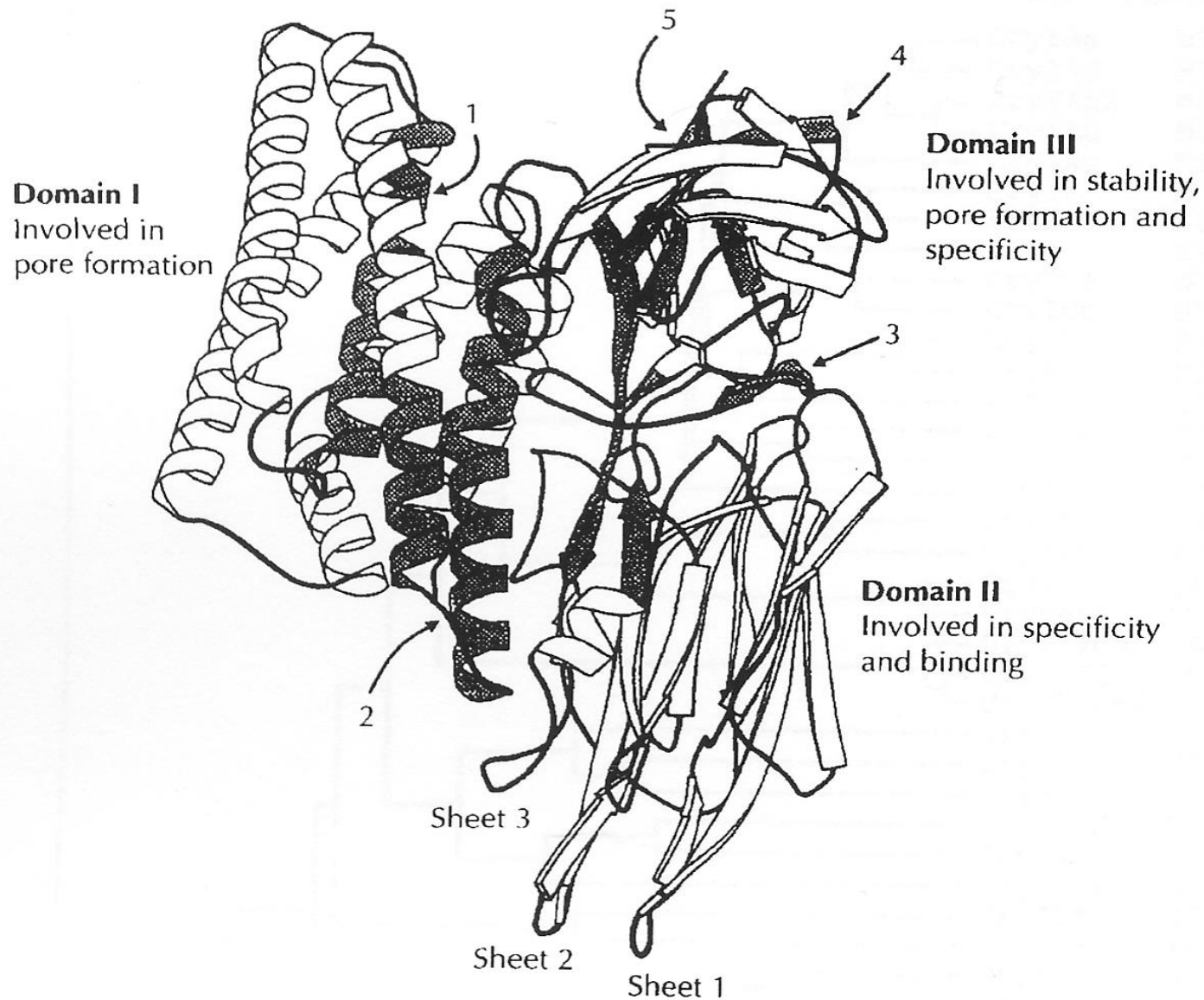
BA4278 [RM] © www.visualphotos.com

Μηχανισμός δράσης Bt



- Προνύμφες που διατρέφονται σε φύλλα φυτών που έχουν δεχτεί ψεκασμό Bt καταπίνουν τους κρυστάλλους
- Στο εντερικό σωλήνα με την δράση πρωτεασών ενεργοποιείται η τοξίνη που προσδένεται διαδοχικά σε υποδοχείς των επιθηλιακών κυττάρων του εντερικού σωλήνα
- Δημιουργία οπών στις μεμβράνες των επιθηλιακών κυττάρων, λύση των μεμβρανών και θάνατο του εντόμου λόγω αναστολή διατροφής

Κρυσταλλική δομή της δ-ενδοτοξίνης



Ποικιλότητα *Bacillus thuringiensis*

Εχουν απομονωθεί περίπου 100 στελέχη Bt:

***B. thuringiensis* subsp. *Kurstaki* και *Aizawai*:** Αποτελεσματικά κατά

λεπιδοπτέρων



***B. thuringiensis* subsp. *Tenebrionis*:** δράση εναντίον κολεοπτέρων



***B. thuringiensis* subsp. *Israelensis*:** δράση εναντίον διπτέρων



Εμπορικά Σκευάσματα *Bt*

- ***B. thuringiensis* subsp. *Kurstaki***: Bactecin 0.2%, Foray 2.2%, Dipel 3.2%, BMP 6.4%,
- ***B. thuringiensis* subsp. *Azawai***: Xentari 3%,
- ***B. thuringiensis* subsp. *Tenebrionis***: Novodor 3%



Προβλήματα *Bacillus thuringiensis*

- Στενό φάσμα δράσης
- Αποτελεσματικότητα άμεσα εξαρτώμενη από το αν το έντομο καταπιεί τα σπόρια και από τις καιρικές συνθήκες
- Αργή δράση καθώς το έντομο συνεχίζει να διατρέφεται μέχρι το θάνατο του



Bt τοξίνη

- Τα τελευταία χρόνια με την βοήθεια της γενετικής μηχανικής έχει δοθεί σημαντική ώθηση στα βιολογικά σκευάσματα του Bt
- Τα **γονίδια cry** που ελέγχουν την λειτουργία και την έκκριση της ενδοτοξίνης απομονώθηκαν από διάφορα στελέχη του βακτηρίου και με την βοήθεια της γενετικής μηχανικής κλωνοποιήθηκαν και επιλεγμένα ενσωματώθηκαν στο γονιδίωμα συγκεκριμένων στελεχών του βακτηρίου καθιστώντας τα γενετικώς τροποποιημένα βακτήρια πιο ελκυστικά στην αγορά



Στόχοι γενετικής τροποποίησης *Bt*

- Διευρυμένο φάσμα δράσης
- Αυξημένη παραγωγή ενδοτοξίνης με αποτέλεσμα αυξημένη ταχύτητα δράσης και μείωσης της δοσολογίας που καθιστά το σκεύασμα πιο οικονομικό για τον παραγωγό

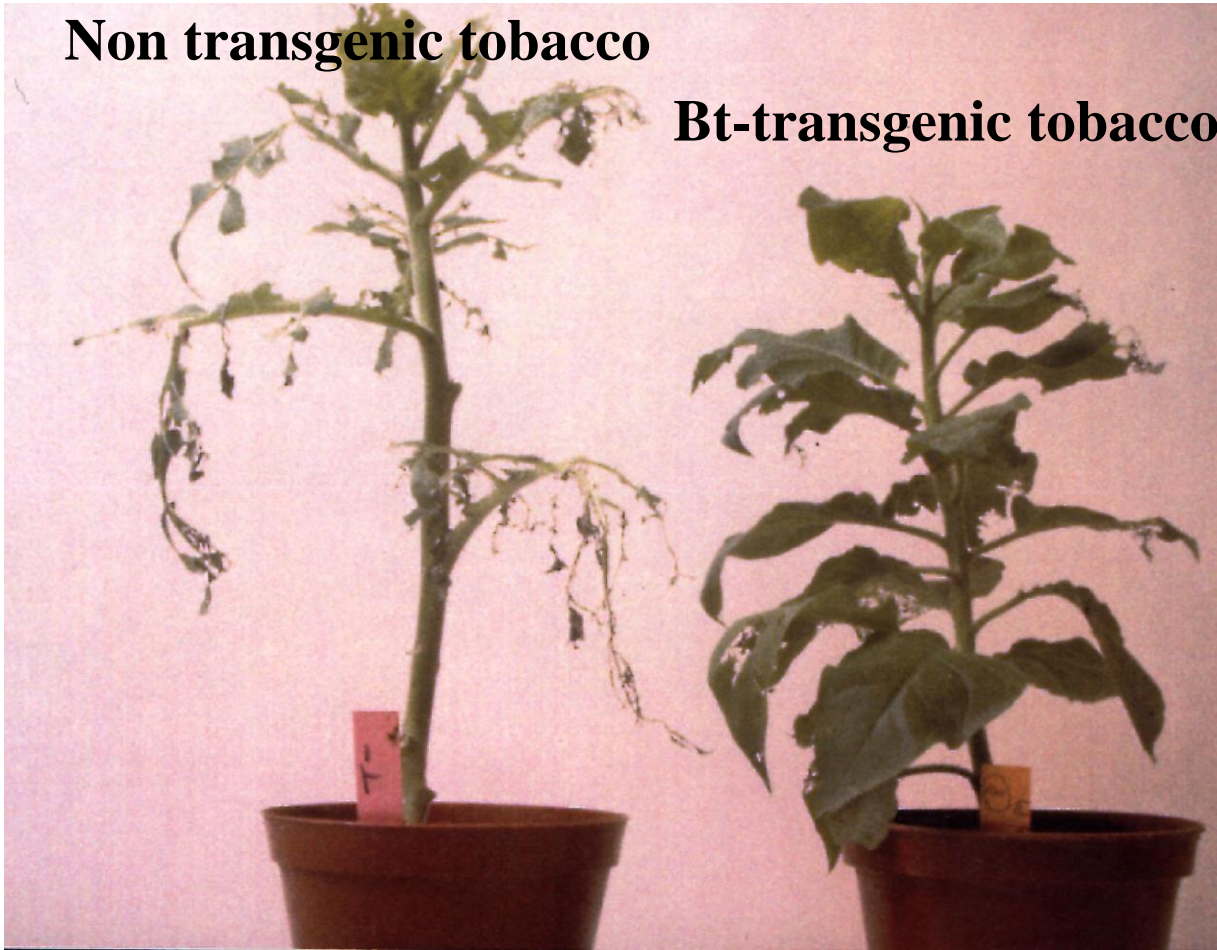


Product	Strain background	Company ^c	Insect order	Comments
Able	<i>kurstaki</i>	Thermo Triology	L	—
Agree	<i>aizawai</i>	Thermo Triology	L	Transconjugant Bt
Biobit	HD1 <i>kurstaki</i>	Abbott	L	—
Bactospeine	<i>kurstaki</i>	Abbott	L	—
Condor	<i>kurstaki</i>	Ecogen	L	Transconjugant Bt
Costar	<i>kurstaki</i>	Thermo Triology	L	—
CRYMAX	<i>kurstaki</i>	Ecogen	L	Recombinant Bt
Cutlass	<i>kurstaki</i>	Ecogen	L	Transconjugant Bt
Design	<i>aizawai</i>	Thermo Triology	L	Transconjugant Bt
Dipel	HD1 <i>kurstaki</i>	Abbott	L	—
Foil	<i>kurstaki</i>	Ecogen	L/C	Transconjugant Bt
Foray	HD1 <i>kurstaki</i>	Abbott	L	—
Florbac	<i>aizawai</i>	Abbott	L	—
Futura	<i>kurstaki</i>	Abbott	L	—
Javelin	HD1 <i>kurstaki</i>	Thermo Triology	L	—
Lepinox	<i>kurstaki</i>	Ecogen	L	Recombinant Bt
MATTCH	<i>Pseudomonas</i>	Mycogen	L	EC ^a
MTRAK	<i>Pseudomonas</i>	Mycogen	C	EC
MVP	<i>Pseudomonas</i>	Mycogen	L	EC
Novodor	<i>tenebrionis</i> ^b	Abbott	C	—
Raven	<i>kurstaki</i>	Ecogen	L/C	Recombinant Bt
Steward	HD1 <i>kurstaki</i>	Thermo Triology	L	—
Thuricide	HD1 <i>kurstaki</i>	Thermo Triology	L	—
Trident	<i>tenebrionis</i>	Thermo Triology	C	—
Vault	HD1 <i>kurstaki</i>	Thermo Triology	L	—
Xentari	<i>aizawai</i>	Abbott	L	—



Non transgenic tobacco

Bt-transgenic tobacco



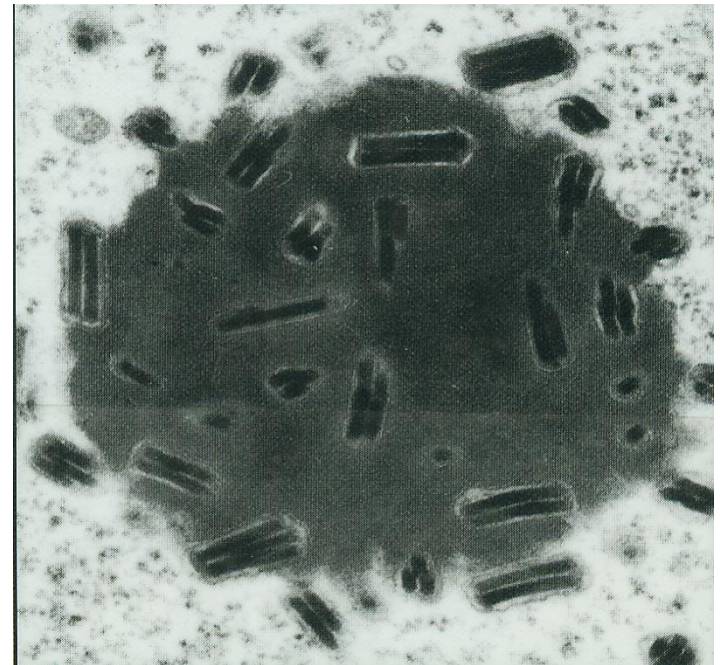
Βιολογικά Εντομοκτόνα

1. *Bacillus thuringiensis*
2. **Βακιλοιοί (*Baculoviruses*)**
3. Εντομοπαθογόνοι μύκητες
4. Εντομοπαθογόνοι νηματώδεις



Εντομοκτόνα Βακιλοϊοί

Ιοί της οικογένειας των βακιλοϊών απομονώθηκαν από παρασιτισμένα έντομα (βασική πηγή απομόνωσης εντομοπαθογόνων ιών) και βρέθηκε ότι μπορούν να παρασιτούν επί εντόμων και άρα να χρησιμοποιηθούν ως «εντομοκτόνα»



Πρακτικά Προβλήματα βακιλοϊών

1. Στενό φάσμα δράσης (πλεονέκτημα ή μειονέκτημα?)
2. Έλλειψη τεχνολογίας για μαζική παραγωγή τους
3. Αργό ρυθμό δράσης (το έντομο συνεχίζει να διατρέφεται)
4. Μικρή υπολειμματικότητα/ ανθεκτικότητα στον αγρό
(πλεονέκτημα ή μειονέκτημα?)



Είδη βακιλοϊών

Δύο ειδών Baculoviruses έχουν αναπτυχθεί

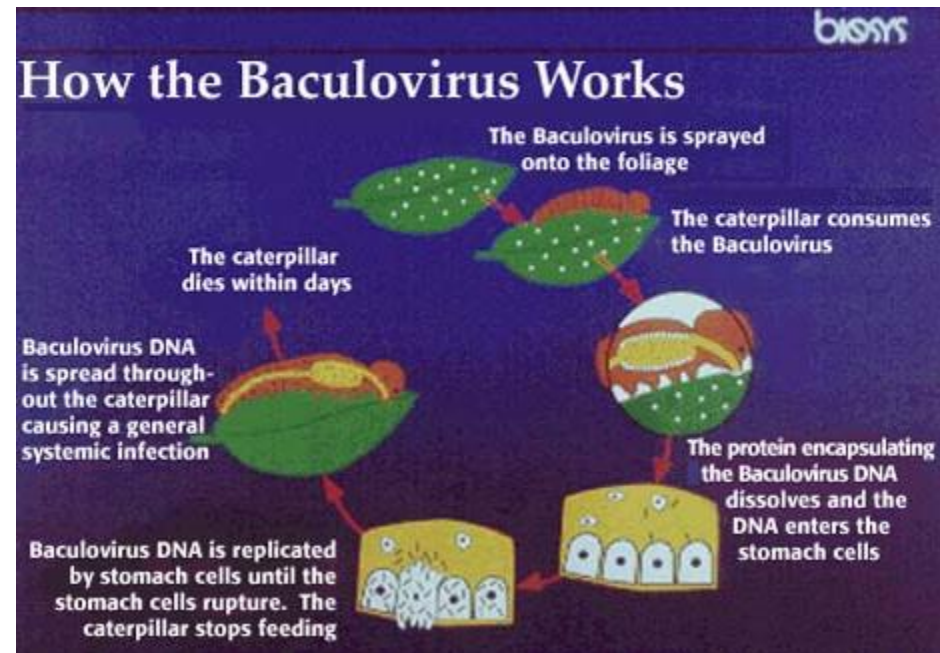
- **Ιοί πολυδενδροειδή πυρήνα (Nuclear Polyhedrosis viruses, NPVs)**
- **Κοκκοειδείς ιοί (Granuloviruses, GVs)**

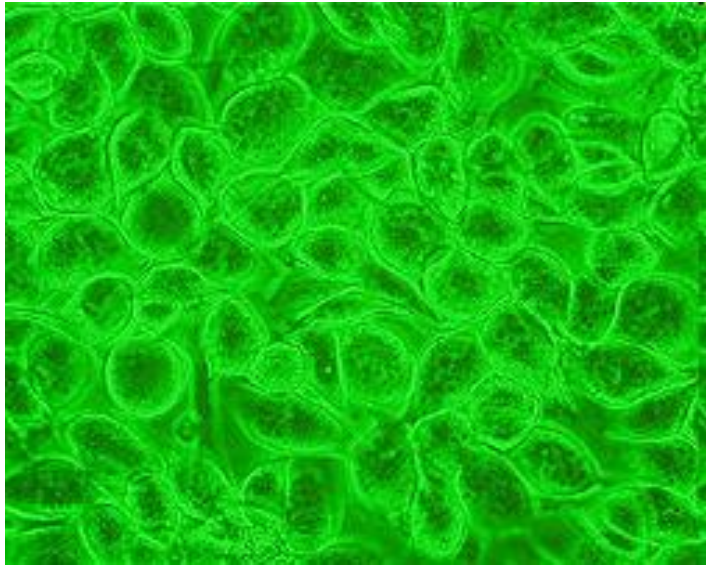
Οι NPVs είναι περισσότερο διαδεδομένοι λόγω

- 1) εύκολης απομόνωσης τους
- 2) απλής και οικονομικής αναπαραγωγής τους στον ξενιστή
- 3) Εύκολης γενετικής τροποποίησης (**διπλοελικόμενο DNA αντί RNA**)

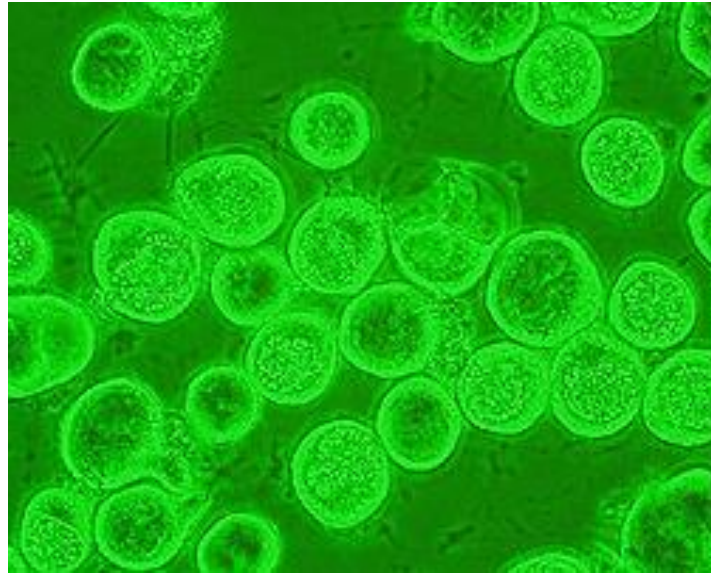
Βακιλοϊοί – Μηχανισμός δράσης

- Εφαρμόζονται κυρίως ως υγρά σκευάσματα στα φύλλα και το έντομο που διατρέφεται στο φύλλο καταπίνει τον ιό
- Η πρωτεϊνική κάψα των βακιλοϊών στο αλκαλικό περιβάλλον του μέσου εντέρου διαλύεται και ελευθερώνει ιοσωμάτια που ξεκινούν την μόλυνση των επιθηλιακών κυττάρων
- Τα ιοσωμάτια μεταφέρονται διασυστηματικά εντός του εντόμου και τελικά το έντομο πεθαίνει σε διάστημα 4-10 ημερών





***Μη προσβεβλημένα
κύτταρα εντόμου***



***Κύτταρα εντόμου
προσβεβλημένα με
ιοσωμάτια AcMNPV***

Γενετική τροποποίηση βακίλοϊών

Η βιοτεχνολογία με την προσθήκη ή σίγηση γονιδίων προσπαθεί να περιορίσει τα προβλήματα εφαρμογής των βακίλοϊών στην γεωργική πρακτική

- **Μείωση του χρονικού διαστήματος μεταξύ μόλυνσης και θανάτου του εντόμου - ξενιστή**
- **Διεύρυνση του φάσματος δράσης των βακίλοϊών**



Οι ιοί που αποτέλεσαν τα εκμαγεία για τις περισσότερες βιοτεχνολογικές έρευνες είναι:

- *Autographa californica* NPV (AcNPV)
- *Bombyx mori* NPV (BmNPV)

Γιατί?

Για τα δύο αυτά είδη υπάρχουν κυτταρικές σειρές στις οποίες μπορούν να καλλιεργηθούν και να παραχθούν υψηλοί πληθυσμοί ιών

Υπάρχουν σκευάσματα στην Ελλάδα;

- **Carpovirusine® 1%**
- **Madex® 1%**

Χρησιμοποιούνται ως υγρά εναιωρηματοποιήσιμα σκευάσματα για την καταπολέμηση της καρπόκαψας σε οπωροφόρα δένδρα όπως μηλιά, αχλαδιά, κυδωνία



Χώρες που έχουν πάρει έγκριση χρήσης σκευάσματα βακίλοιών



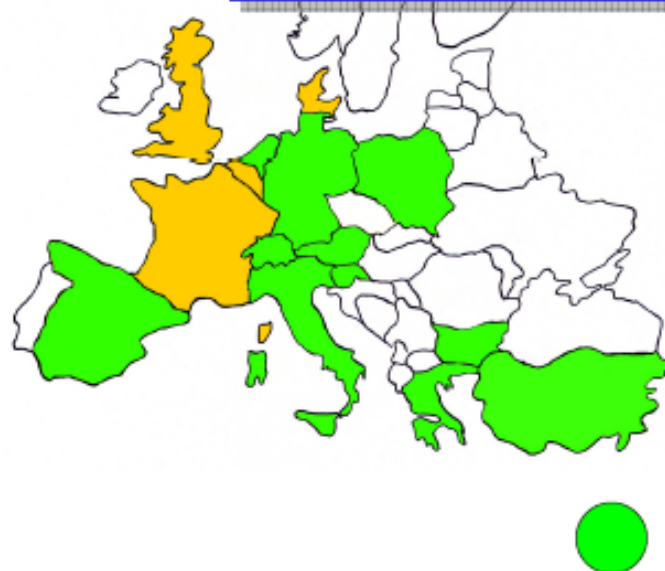
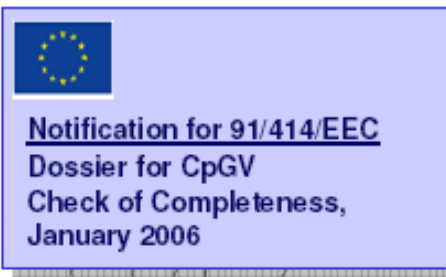
Registrations of MADEX (March 2006)

**MADEX is registered
in 13 countries:**

Austria, Bulgaria, Germany,
Greece, Holland, Italy,
Luxemburg, New Zealand,
Poland, Slovenia, Spain,
Switzerland and Turkey

**Registration of MADEX is
expected soon in:**

Argentina, Australia, Belgium,
Cyprus, Denmark, France,
Morocco, South Africa
and United Kingdom



Τι γνωρίζουμε για το γονιδίωμα των βακίλοϊών;

- Διπλής έλικας DNA
- 150 γονίδια
- Ο ρόλος 30 γονιδίων έχει αναγνωρισθεί
 - **διπλασιασμός DNA**
 - **μεταγραφή γονιδίων**
 - **δομικά πολυπεπτίδια**
 - **γονίδιο *egt***
 - **γονίδιο *p35***
 - **πρωτεάσες**
 - **χιτινάσες**



Πως μπορούμε να δημιουργήσουμε GM Βακιλοΐους με αυξημένη αποτελεσματικότητα?

- Ενσωμάτωση γονιδίων που κωδικοποιούν εντομοκτόνες τοξίνες και προσδίδουν στους βακιλοΐους πιο άμεση εντομοκτόνο δράση
- Σίγηση γονιδίων των βακιλοΐών που επηρεάζουν σημαντικά τον βιολογικό κύκλο των εντόμων – στόχων
- Ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση γονιδίων που ελέγχουν το φάσμα των ξενιστών του κάθε βακιλοΐου



***Ενσωμάτωση γονιδίων που κωδικοποιούν
εντομοκτόνες τοξίνες και δίνουν στους
βακίλοϊούς άμεση εντομοκτόνο δράση***



Γενετικώς Τροποποιημένοι Βακιλοϊοί

Γονίδιο	% αύξηση στην θνησιμότητα
Εστεράση ορμόνης νεότητας	20%
Bt toxin	2 x LD ₅₀
Scorpion toxin (AaIT)	30-40%
Mite-toxin (Txp-I)	30-40%
Wasp Toxin	-



AcNPV – τοξίνη του σκορπιού

- Το 1991 αναφέρθηκε η δημιουργία τροποποιημένων **AcNPVs (AST-3)** με το **γονίδιο του σκορπιού της Β. Αφρικής** ώστε να βελτιωθεί η ταχύτητα δράσης των βακιλοϊών και να μειωθεί το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ μόλυνσης και οριστικού θανάτου του εντόμου
- Πειράματα αγρού με το **AcNPV AST-3** έδειξαν σημαντική μείωση της εντομολογικής προσβολής του λαχανικών φυτών συγκριτικά με την αποτελεσματικότητα του άγριου στελέχους του βακιλοϊού AcNPV

*Σίγηση γονιδίων των βακίλοϊών που
επηρεάζουν σημαντικά τον βιολογικό
κύκλο των εντόμων – στόχων*



Σίγηση του γονιδίου *Egt*

Το προσβεβλημένο έντομο συνεχίζει να διατρέφεται για 4-14 ημέρες σε υψηλούς ρυθμούς

- Οι βακίλοϊοί κατέχουν το γονίδιο ***egt*** (ecdysteroid UDP-glucosyl transferase) που ενεργοποιεί τη μεταφορά glucosyl-UDP στις ορμόνες έκδυσης των εντόμων παρεμποδίζοντας την έκδυση του προσβεβλημένου εντόμου
- **Τα προσβεβλημένα έντομα συνεχίζουν να διατρέφονται με διπλάσιο ρυθμό από ότι μη μολυσμένα έντομα!!!!**



Egt - στελέχη βακίλοϊών παρουσίασαν την ίδια παθογένεια με τα άγριου τύπου στελέχη αλλά τα μολυσμένα έντομα παρουσίασαν μειωμένο ρυθμό διατροφής και πέθαναν ταχύτερα **(Γιατί?)**

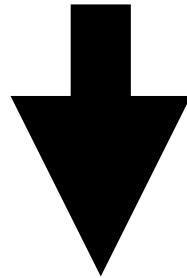


***Ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση γονιδίων
που ελέγχουν το φάσμα των ξενιστών του
κάθε βακίλοϊού***



Έλεγχος φάσματος δράσης βακιλοϊών

Οι βακιλοοί μπορούν να εισέλθουν με ευκολία σε πλήθος εντόμων και θηλαστικών χωρίς όμως να είναι ικανοί να προκαλέσουν και τον πολλαπλασιασμό του DNA τους σε όλα τα έντομα στα οποία εισέρχονται



Οι εξωκυτταρικοί υποδοχείς των ιών στα έντομα είναι γενικοί και μη εξειδικευμένοι στα διάφορα είδη εντόμων



Γονίδιο p143

- Το γονίδιο **p143** βρέθηκε ότι ελέγχει σε σημαντικό βαθμό την επιλογή του εντόμου-ξενιστή και κατά συνέπεια το φάσμα δράσης του ιού
- Γενετικοί ανασυνδυασμοί των p143 γονιδίων μεταξύ των BmNPV και AcNPV οδήγησε στον σχηματισμό ενός νέου p143s γονίδιο που διαφοροποιούνταν κατά 14 αμινοξέα με το p143 AcNPV και προσέδωσε στους ιούς που το κατείχαν την ικανότητα να προσβάλουν έντομα-ξενιστές και των δύο προγόνων βακιλοϊών BmNPV και AcNPV

Γονίδια p35 & iap

- Το γονίδιο **p35** βρέθηκε ότι ελέγχει την επιλογή του εντόμου-ξενιστή αναστέλωντας τον κυτταρικό θάνατο που ενεργοποιεί το έντομο για να περιορίσει την προσβολή από τον ιό. Το γονίδιο **p35** αναστέλλει την βιοσύνθεση πρωτεασών που προκαλούν θανάτωση των κυττάρων του εντόμου που έχουν προσβληθεί από τον ιό.
- Το γονίδιο **iap (inhibitor of apoptosis gene)** βρέθηκε να αντικαθιστά το p35 στον ιό *Cydia pomonella* GV



Ασφάλεια χρήσης GM βακίλοϊών (GMB)

1. Πιθανές επιδράσεις των GMB σε οργανισμούς μη-στόχους ή ωφέλιμα έντομα ?
2. Η γενετική τροποποίηση παρέχει στους ιούς εκλεκτικό πλεονέκτημα στο περιβάλλον σε σχέση με τα αντίστοιχα άγρια στελέχη ?
3. Εμφάνιση φυσικών ανασυνδυασμών μεταξύ ομόλογων περιοχών του γονιδιώματος GMB και βακίλοϊών που προσβάλλουν θηλαστικά ?
4. Εμφάνιση ανθεκτικότητας?



Επιδράσεις GMB σε οργανισμούς μη-στόχους?

- Η κύρια ανησυχία οφείλεται στην ελευθέρωση ιών που δρουν παράγοντας τοξίνες και πιθανότατα να προκαλέσουν τον θάνατο ωφέλιμων εντόμων που παρασιτούν επί εντόμων που έχουν προσβληθεί από ιούς
- **Πειράματα με τον ιό AcNPV που παράγει την τοξίνη του σκορπιού** έδειξαν ότι αρπακτικά έντομα (*Polistes metricus*) που διατρέφονταν σε προσβεβλημένες προνύμφες του εντόμου ξενιστή δεν παρουσίασαν καμία αναστολή στην ανάπτυξη τους και στους πληθυσμούς τους

Η γενετική τροποποίηση οδηγεί σε αυξημένη επιβίωση των ιών?

- Πειράματα εργαστηρίου έδειξαν ότι ιοί που παράγουν τοξίνη παρουσίαζαν **1) μειωμένη ανταγωνιστικότητα 2) μειωμένη ικανότητα παραγωγής απογόνου 3) μειωμένη παραγωγή ιοσωματίων στο εσωτερικό του εντόμου-ξενιστή**
- Πειράματα αγρού έδειξαν ότι ιοί που παράγουν τοξίνη παρουσίασαν μειωμένη δευτερογενή διασπορά καθώς τα μολυσμένα έντομα παρατηρήθηκε ότι έπεφταν από τα φυτά στο έδαφος και συνεπώς μειωνόταν η πιθανότητα για προσβολή νέων προνυμφών που ζούσαν στο φυτό

Εμφάνιση φυσικών ανασυνδυασμών μεταξύ ομόλογων περιοχών του γονιδιώματος των GMB και Βακιλοϊών που προσβάλλουν θηλαστικά ?

- Βακιλοϊοί που προσβάλλουν την γαρίδα παρουσιάζουν εκτεταμένη ομολογία στο γονιδίωμα τους σε σχέση με τους εντομοπαθογόνους βακιλοϊούς
- Εκτεταμένη εφαρμογή των εντομοπαθογόνων βακιλοϊών σε περιοχές κοντά σε υδροφόρα συστήματα όπου υπάρχει ο βακιλοϊός της γαρίδας μπορεί να οδηγήσει σε γενετικούς ανασυνδυασμούς με απρόβλεπτες συνέπειες



Εμφάνιση Ανθεκτικότητας ?

Μικρή πιθανότητα εμφάνισης ανθεκτικότητας λόγω:

- Μη ιδιαίτερα εξειδικευμένου μηχανισμού δράσης
- Ανθεκτικότητα σε GMB που παράγουν τοξίνες δεν σημαίνει ότι το ανθεκτικό έντομο (στις τοξίνες) θα επιζήσει και θα πολλαπλασιαστεί διότι πιθανότατα θα πεθάνει από την προσβολή από τον ιό αργότερα



Τι μέλλον έχουν οι Βακιλοϊοί?

- **Ανακάλυψη νέων NPVs/GVs με διαφορετικό φάσμα δράσης** και απομόνωση των γονιδίων που ελέγχουν την παθογένεια και το φάσμα δράσης τους. Τα γονίδια αυτά σε συνδυασμό με ήδη υπάρχοντα θα αποτελέσουν δεξαμενή γενετικού υλικού για την γενετική βελτίωση των βακιλοϊών
- **Η ανακάλυψη κυτταρικών σειρών** για περισσότερους NPVs/GVs θα βοηθήσει στην μαζική παραγωγή τους αλλά και θα καταστήσει ευκολότερη και ταχύτερη την γενετική τους βελτίωση
- **Αντιμετώπιση θεμάτων ασφαλείας των GMB** που έχουν προοπτική χρήσης στην γεωργική πράξη

Βιολογικά Εντομοκτόνα

1. *Bacillus thuringiensis*

2. Βακιλοιοί (*Baculoviruses*)

3. Εντομοπαθογόνοι μύκητες

4. Εντομοπαθογόνοι νηματώδεις



Beauveria bassiana: Ασκομύκητας που προσβάλλει διάφορα έντομα που προσβάλλουν καλλιεργούμενα φυτά



Ανακαλύφθηκε το 1835 ως μύκητας που προσβάλλει τους μεταξοσκώληκες

Βιολογικά Εντομοκτόνα

1. *Bacillus thuringiensis*
2. Βακιλοιοί (*Baculoviruses*)
3. Εντομοπαθογόνοι μύκητες
- 4. Εντομοπαθογόνοι νηματώδεις**



Εντομοπαθογόνοι Νηματώδεις

Νηματώδεις που διαβιούν στο έδαφος και έχουν την ικανότητα να παρασιτούν έντομα εδάφους

Έχουν χρησιμοποιηθεί ως βιολογικά εντομοκτόνα σε διάφορες χώρες της Ευρώπης και στις ΗΠΑ



Μηχανισμός Δράσης

Οι νηματώδεις (2ο προνυμφικό στάδιο) αναπτύσσουν
συμβιωτική σχέση με **βακτήρια των γενών**

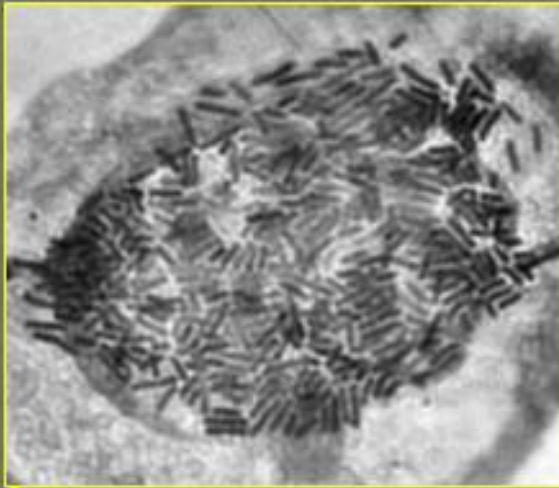
Xenorhabdus και Photorhabdus τα οποία και διαβιούν
εντός του νηματώδη σε ειδικά οργανίδια

Με την είσοδο τους εντός του εντόμου, τα βακτήρια
ελευθερώνονται στο αιμόκιλο και προκαλούν σηψαιμία και
θάνατο εντός 24-48 ωρών ελευθερώνοντας τοξίνες



Συμβίωση βακτηρίων εντός των νηματωδών

Xenorhabdus nematophila inside vesicle



Free-living infective
juvenile nematode :
Steinernema carpocapsae



Εντομοπαθογόνοι Νηματώδεις

- **Steinernema** (νηματώδης) – **Xenorhabdus** (βακτήριο)
- **Heterohabditis** (νηματώδης) – **Photorhabdus** (βακτήριο)

Τα βακτήρια χρησιμοποιούν τους νηματώδεις ως όχημα
ώστε να εισέλθουν στο εσωτερικό του εντόμου ενώ **οι**
νηματώδεις χρησιμοποιούν τα βακτήρια για να
ολοκληρώσουν τον βιολογικό τους κύκλο



Εμπορικά σκευάσματα Ε.Ν.

Εμπορικό όνομα

Νηματώδης

Nemasys II

Heterohabditis magidis

Biovector 355

Steinernema ribobravis

Devour

Steinernema ribobravis

Nemasys

Steinernema feltiae

Entonem

Steinernema feltiae

X-Gnat

Steinernema feltiae

Magnet

Steinernema feltiae

Gruiser

Heterohabditis bacteriophora

Heteromask

Heterohabditis bacteriophora



Xenorhabdus - Photorhabdus

Αποτελούν πηγή παραγωγής τοξινών, ενζύμων και άλλων πρωτεϊνών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διάφορες βιομηχανικές εφαρμογές

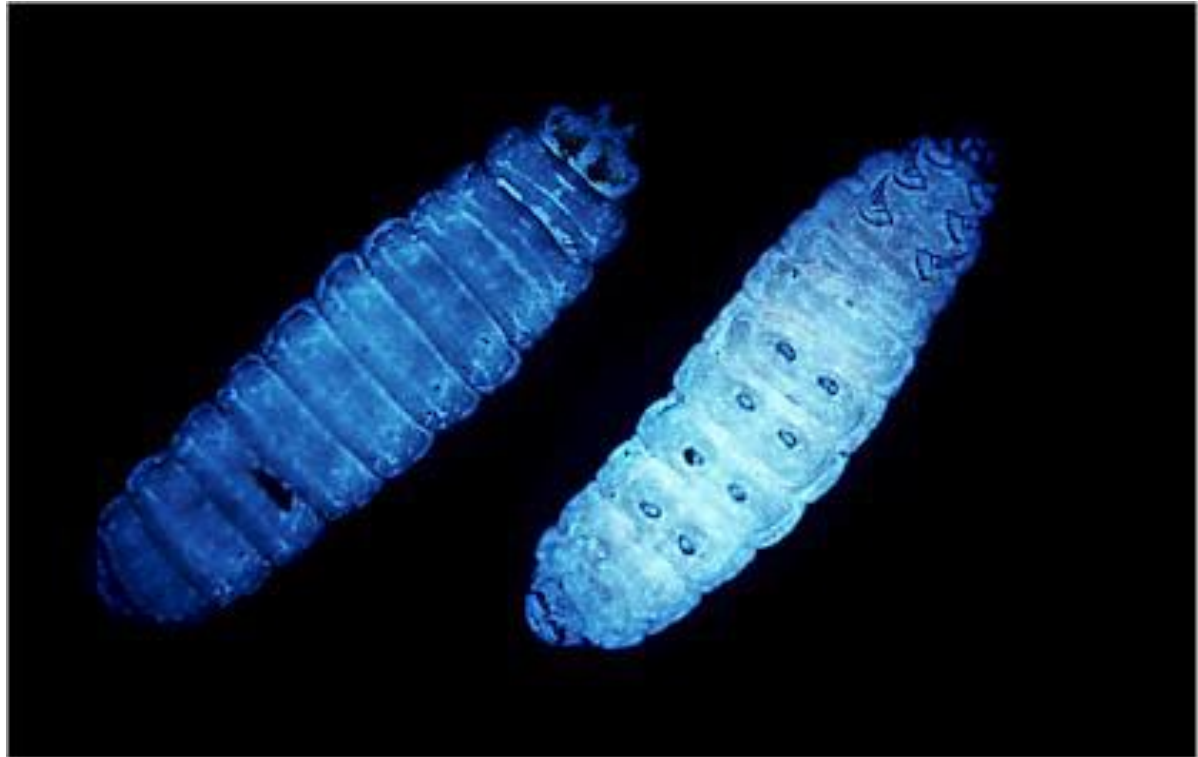
- Οι **τοξίνες** που παράγουν έχουν απομονωθεί σε καθαρή μορφή και έχουν πολύ υψηλή εντομοκτόνο δράση σε χαμηλές συγκεντρώσεις
- Τα βακτήρια *Photorhabdus* παράγουν μια **κρυσταλλική πρωτεΐνη** που περιέχει ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις λυσίνης και μεθειονίνης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ιδιαίτερα θρεπτική ζωοτροφή

Xenorhabdus - Photorhabdus

- Τα γονίδια που κωδικοποιούν την παραγωγή των τοξινών από τα βακτήρια του γένους *Xenorhabdus* και *Photorhabdus* έχουν απομονωθεί και γίνονται προσπάρθειες για την ενσωμάτωση τους σε καλλιεργούμενα φυτά για την παραγωγή GM φυτών που θα παράγουν τις τοξίνες αυτές
- Τα **γονίδια *xpt*** που κωδικοποιούν την παραγωγή των τοξινών από τα *Xenorhabdus* παρουσιάζουν χαμηλή ομολογία με τα **γονίδια *tca*** των *Photorhabdus* αλλά και άλλα γονίδια που κωδικοποιούν γνωστές τοξίνες



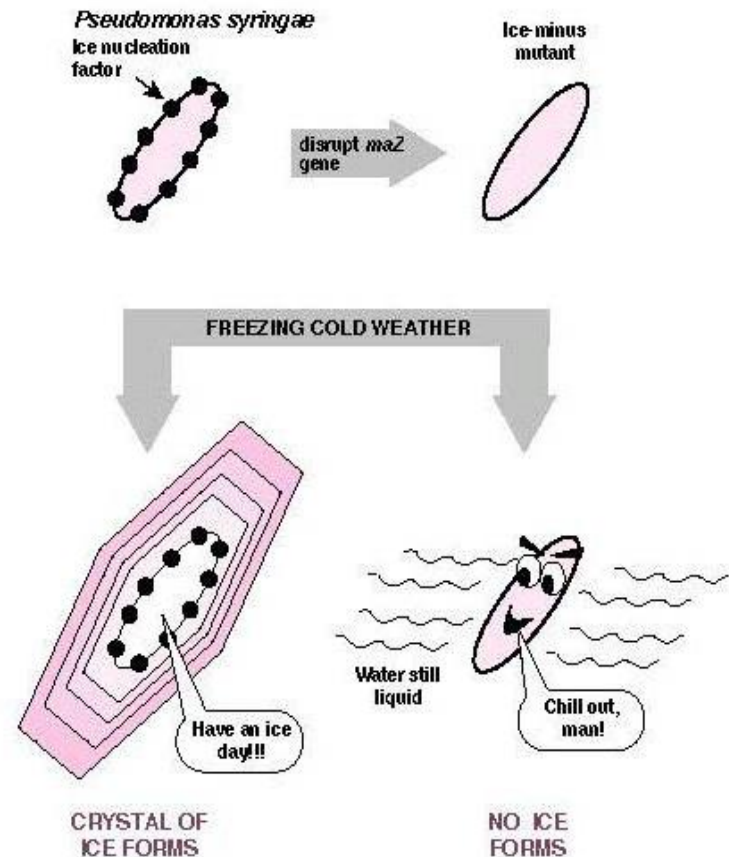
Τα βακτήρια του γένους *Photorhabdus* περιέχουν και γονίδια φθορισμού έτσι τα έντομα που προσβάλλονται φθορίζουν



Ice Minus Βακτήρια

Στελέχη *Pseudomonas syringae* (**ice plus bacteria**) που απομονώθηκαν από την ατμόσφαιρα και από την επιφάνεια φύλλων φράουλας παράγουν πρωτεΐνες στην κυτταρική τους επιφάνεια που δρουν ως παγοπυρήνες σε θερμοκρασίες υψηλότερες από ότι αβιοτικοί πυρήνες (σωματίδια σκόνης

Το γονίδιο (*inaZ*) που ρυθμίζει την παραγωγή της μεμβρανικής πρωτεΐνης απομονώθηκε και μετά από σίγηση του δημιουργήθηκαν βακτήρια *P. syringae ice-minus*



Εφαρμογή Ice-Minus Βακτηρίων

Τα βακτήρια *ice-minus* θα πρέπει να εφαρμόζονται σε σημαντικές ποσότητες ώστε να καταφέρουν να εκτοπίσουν τον ενδογενή πληθυσμό των *ice-plus* βακτηρίων





Πειράματα σε αγρό όπου
ελήφθησαν όλα τα
απαραίτητα μέτρα ώστε αν
μην διαφύγουν τα
βακτήρια σε παρακείμενες
περιοχές έδειξαν ότι τα *ice-*
minus παρά το ότι έδειξαν
ελπιδοφόρα αποτελέσματα
δεν επέζησαν σε υψηλούς
πληθυσμούς

Κατηγορίες φυτοπροστατευτικών προϊόντων βιολογικής προέλευσης

- Βιολογικά Εντομοκτόνα
- **Βιολογικά Μυκητοκτόνα**
- Βιολογικά Ζιζανιοκτόνα



Βιολογικά μυκητοκτόνα

- **Βακτήρια ή Μύκητες για καταπολέμηση παθογόνων εδάφους**
- Βακτήρια ή Μύκητες για καταπολέμηση παθογόνων φυλλώματος



Βιολογικά μυκητοκτόνα εδάφους

Βακτήρια και μύκητες που διαβιούν στην ριζόσφαιρα και έχουν την ικανότητα με διάφορους μηχανισμούς να προστατεύουν τα φυτά από προσβολές από φυτοπαθογόνους μύκητες με **έμμεσους ή άμεσους μηχανισμούς**



Μηχανισμοί δράσης

- Παραγωγή αντιβιοτικών
- Παραγωγή σιδηροφόρων μορίων
- Ανταγωνισμός για χώρο και θρεπτικά στοιχεία
- Ενεργοποίηση μηχανισμών άμυνας του φυτού
- Παραγωγή ενζύμων που καταλύουν τις κυτταρικές μεμβράνες φυτοπαθογόνων μυκήτων
- Μεταβολισμός και υδρόλυση ουσιών που παράγονται από τα παθογόνα



Παραγωγή Αντιβιοτικών

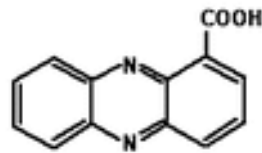
Έχουν απομονωθεί μύκητες και βακτήρια από την ριζόσφαιρα που έχουν την ικανότητα να παράγουν αντιβιοτικά με βιοκτόνο δράση κατά φυτοπαθογόνων μυκήτων



Αντιβιοτικά που παράγονται από βακτήρια ή μύκητες της ριζόσφαιρας

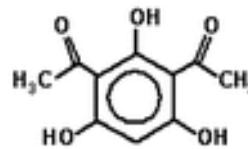
- agrocin 84, agrocin 434
- 2,4-diacetylphloroglucinol

➤ herbicolin

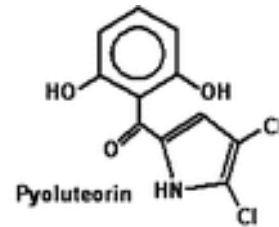


Phenazine-1-carboxylate

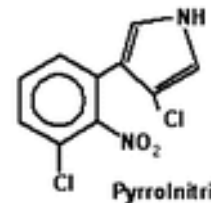
➤ oomycin



2,4-Diacetylphloroglucinol

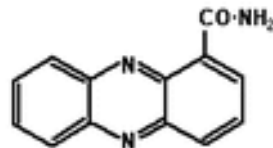


Pyoluteorin



Pyrrolnitrin

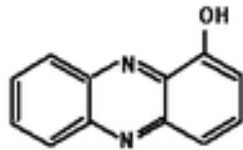
➤ phenazine



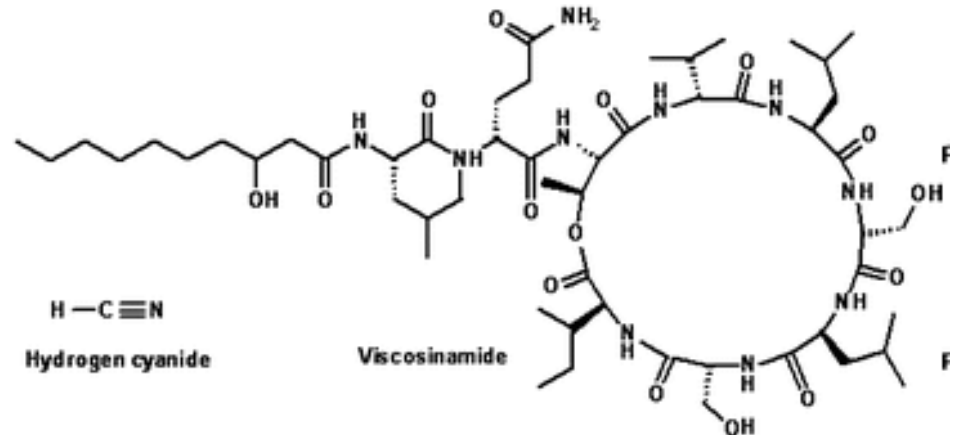
Phenazine-1-carboxamide

➤ pyoluteorin

➤ pyrrolnitrin



Methiocyanine

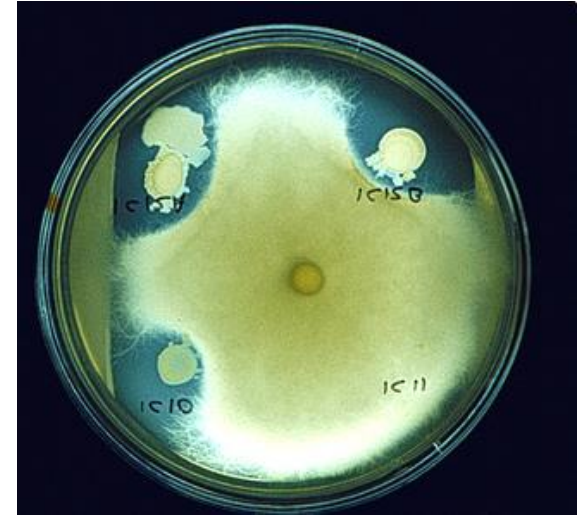


Hydrogen cyanide

Viscosinamide

Πως μπορούμε να επιβεβαιώσουμε την συμμετοχή του αντιβιοτικού στην αντιμυκητιακή δράση;

➤ Απομόνωση του αντιβιοτικού και εξέταση του φάσματος αντιμικροβιακής δράσης *in vitro*



➤ Μεταλλάγματα που τους έχει αφαιρεθεί η ικανότητα παραγωγής του αντιβιοτικού και εξέταση της δράσης του *in vivo*

➤ Μεταλλάγματα που υπερ-παράγουν το συγκεκριμένο αντιβιοτικό και εξέταση της δράσης του *in vivo*



Παραγωγή σιδηροφόρων ουσιών

Μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν από την ριζόσφαιρα παρήγαγαν υψηλές ποσότητες **σιδηροφόρων ουσιών** μέσω των οποίων συμπλοκοποιούν Fe^{+3} και έτσι απορροφούν το σύνολο των διαθέσιμων ποσοτήτων Fe στο έδαφος δημιουργώντας έλλειψη Fe στην ριζόσφαιρα για τους φυτοπαθογόνους μύκητες ή βακτήρια



Παράδειγμα

GM βακτήριο *Pseudomonas putida* από το οποίο είχε αφαιρεθεί η ικανότητα να παράγει σιδηροφόρες ουσίες παρουσίασε μειωμένη αποτελεσματικότητα στην καταπολέμηση του μύκητα *Fusarium oxysporum* στην τομάτα σε αντίθεση με το άγριο στέλεχος *Pseudomonas putida* που μπορούσε να παράγει σιδηροφόρες ουσίες και είχε υψηλή αποτελεσματικότητα



Ανταγωνισμός για χώρο και θρεπτικά στοιχεία

Ορισμένοι μικροοργανισμοί της ριζόσφαιρας δρουν ως βιολογικά βιοκτόνα διαμέσου της ικανότητας τους να ανταγωνίζονται για χώρο και θρεπτικά στοιχεία στην ριζόσφαιρα εκτοπίζοντας τους πληθυσμούς των φυτοπαθογόνων



Ανταγωνισμός για χώρο και θρεπτικά στοιχεία

Στελέχη βακτηρίων ή μυκήτων του ιδίου γένους με τα φυτοπαθγόνα τα οποία δεν παρουσιάζουν όμως καμία φυτοπαθγόνο ικανότητα και μπορούν να αποικήσουν την ριζόσφαιρα εις βάρος του φυτοπαθγόνου μικροοργανισμού

Στελέχη *Pseudomonas syringae* χωρίς φυτοπαθγόνο ικανότητα όταν εμβολιάστηκαν στην ριζόσφαιρα φυτών τομάτας μαζί με τα αντίστοιχα φυτοπαθγόνα στελέχη κατάφεραν να περιορίσουν σημαντικά την προσβολή των φυτών



Ενεργοποίηση μηχανισμών άμυνας

Ορισμένα βακτήρια (*Pseudomonas*, *Bacillus*) και μύκητες (*Fusarium*, *Trichoderma*) έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν μηχανισμούς άμυνας των φυτών και το φαινόμενο αυτό ονομάζεται **Επαγόμενη Διασυστηματική Ανθεκτικότητα (Induced Systemic Resistance)**



Ενεργοποίηση μηχανισμών άμυνας

Οι μηχανισμοί άμυνας του φυτού που ενεργοποιούνται είναι:

1. Αυξημένη παραγωγή ενζύμων όπως **χιτινάσες, υπεροξειδάσες, πολυφαινολικές οξειδάσες** που καταλύουν τις κυτταρικές μεμβράνες των παθογόνων μυκήτων
2. Παραγωγή **φυτοαλεξινών** – τοξικές ουσίες με βιοκτόνο δράση
3. **Εναπόθεση λιγνίνης ή φαινολικών** στα επιδερμικά κύτταρα που έχουν προσβληθεί ώστε να περιοριστεί η περαιτέρω είσοδος του παθογόνου



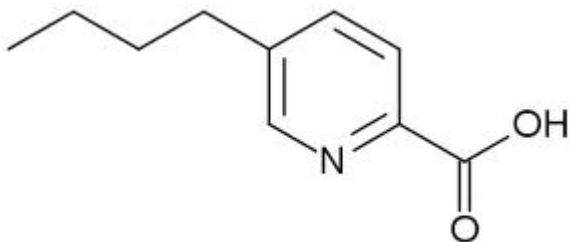
Μεταβολισμός ουσιών που παράγονται από τα παθογόνα

Διάφορα βακτήρια έχουν την ικανότητα να παράγουν ένζυμα που μεταβολίζουν και απενεργοποιούν ουσίες που παράγουν φυτοπαθογόνοι μύκητες στα πλαίσια του μηχανισμού προσβολής των φυτών



Μεταβολισμός ουσιών που παράγονται από τα παθογόνα

Βακτήρια *Cladosporium*, *Bulkolderia cepacia*, *Pseudomonas solanacearum* παράγουν ένζυμα που υδρολύουν το **φουζαρικό οξύ** που είναι η ουσία που παράγεται από τον μύκητα *Fusarium* sp. και προκαλεί σημαντικές ζημιές στο ριζικό σύστημα των φυτών



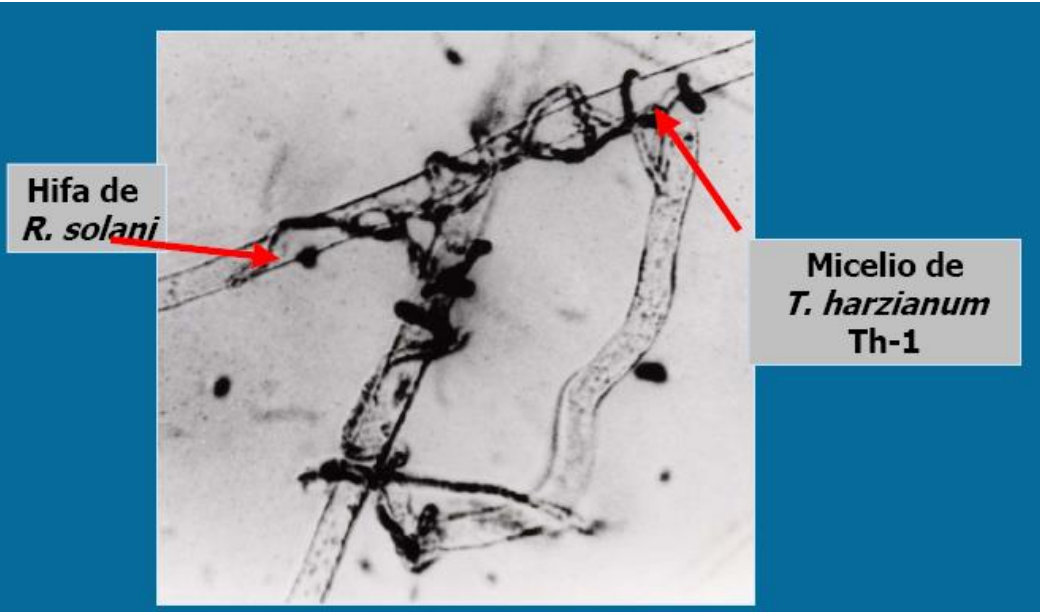
Άμεσος παρασιτισμός

Διάφοροι μύκητες έχουν την ικανότητα να παρασιτούν τις μυκηλιακές υφές άλλων μυκήτων – φυτοπαθογόνων διαφόρων φυτών



Η σημασία και σημαντικότητα αυτού του μηχανισμού *in vivo* στην ριζόσφαιρα των φυτών δεν έχει αποδειχτεί πλήρως

Μύκητες του γένους *Trichoderma* παρασιτίζουν συχνά μυκηλιακές υφές διαφόρων φυτοπαθογόνων μυκήτων όπως *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*



Βιολογικά μυκητοκτόνα

- Βακτήρια/Μύκητες για καταπολέμηση παθογόνων εδάφους
- **Βακτήρια/Μύκητες για καταπολέμηση παθογόνων φυλλώματος**



Βιολογικά Μυκητοκτόνα Φυλλώματος

Εμπορικά σκευάσματα κυκλοφορούν στην παγκόσμια αγορά και περιέχουν σπóρια μυκήτων που δρουν εναντίον φυτοπαθογόνων μυκήτων φυλλώματος



AQ 10: *Ampelomyces quisqualis* παρασιτίζει υφές και κονίδια των μυκήτων που προκαλούν την ασθένεια ωίδιο

