



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

*«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη
γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»*

**ΕΝΟΤΗΤΑ 2 - Σύγχρονες τεχνικές βιοανάλυσης στη γεωργία και το
περιβάλλον**

Διάλεξη 22.5.2014

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ & ΝΕΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΓΕΩΡΓΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

Βιολογικά γεωργικά φάρμακα: Χρήσεις και προοπτικές

Πλήθος μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία έτη καταδεικνύουν τις σημαντικές αρνητικές επιδράσεις των συνθετικών γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον αλλά και στην υγεία των ανθρώπων. Η σημαντική υποβάθμιση της οικολογικής και χημικής ποιότητας των επιφανειακών και υπόγειων υδροφόρων συστημάτων που προκύπτει από την παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γεωργικών φαρμάκων έχει προκαλέσει προβληματισμό στην κοινή γνώμη αλλά και στον αγροχημικό βιομηχανικό τομέα. Παράλληλα ορισμένα συνθετικά γεωργικά φάρμακα παρουσιάζουν υψηλή οξεία και χρόνια τοξικότητα σε ανώτερους ζωικούς οργανισμούς συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου αλλά και έναντι οργανισμών μη-στόχων. Όλα τα παραπάνω οδήγησαν τις μεγαλύτερες εταιρείες αγροχημικών να ξεκινήσουν επενδύσεις προς την παραγωγή νέων βιολογικής προέλευσης γεωργικών φαρμάκων τα οποία θα εφαρμόζονται τόσο σε συμβατικές αλλά και στις βιολογικές καλλιέργειες.

Τα βιολογικά γεωργικά φάρμακα μπορούν να διαχωριστούν σε δύο βασικές κατηγορίες με βάση το είδος του δραστικού παράγοντα που περιέχουν:

- Γεωργικά φάρμακα στα οποία οι δραστικοί παράγοντες είναι μικροοργανισμοί που έχουν την δυνατότητα να σκοτώνουν έντομα, φυτά ή άλλους φυτικούς εχθρούς
- Γεωργικά φάρμακα στα οποία οι δραστικοί παράγοντες είναι φυσικά προϊόντα, ουσίες και εκχυλίσματα που παράγονται από μικροοργανισμούς ή φυτά και έχουν βιοκτόνο δράση

Για να μην υπάρξει σύγχυση στο πλαίσιο της παρούσας διάλεξης και παρουσίασης η δεύτερη κατηγορία γεωργικών φαρμάκων αναφέρεται ως βοτανικά γεωργικά φάρμακα ή φυσικά προϊόντα. Στην παρούσα διάλεξη θα εστιάσουμε στα γεωργικά φάρμακα της πρώτης κατηγορίας που στην διεθνή βιβλιογραφία ονομάζονται και ως Biological Control Agents (BCA)

Θέση των βιολογικών γεωργικών φαρμάκων στην αγορά

Τα βιολογικής προέλευσης γεωργικά φάρμακα καταλαμβάνουν περίπου 1.3% της παγκόσμιας αγοράς με τα βιολογικά εντομοκτόνα να καταλαμβάνουν το 4-5% της αγοράς εντομοκτόνων. Αρχικά τα βιολογικά γεωργικά φάρμακα χρησιμοποιούνταν κυρίως σε βιολογικούς αγρούς όπου δεν επιτρέπεται η χρήση συνθετικών γεωργικών φαρμάκων. Κατά τα τελευταία χρόνια και με την εφαρμογή της Ολοκληρωμένης Καταπολέμησης τα βιολογικά γεωργικά φάρμακα πήραν θέση και εφαρμόζονται και σε συμβατικούς αγρούς καθώς οι καταναλωτές ζητούν γεωργικά προϊόντα υψηλής αξίας και ελεύθερα υπολειμμάτων συνθετικών γεωργικών φαρμάκων.

Επίσης, η εισαγωγή ευνοϊκών νομοθετικών ρυθμίσεων για τα βιολογικά σκευάσματα οδήγησε εταιρείες αγροχημικών να επενδύσουν περισσότερο στην παραγωγή τους. Για παράδειγμα, 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 βιολογικών γεωργικών φαρμάκων με βάση τον στόχο

Τα βιολογικά γεωργικά φάρμακα ανάλογα με το είδος του οργανισμού - στόχου κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες:

- Βιολογικά Εντομοκτόνα
- Βιολογικά Μυκητοκτόνα
- Βιολογικά Ζιζανιοκτόνα

Μεταξύ αυτών τα βιολογικά εντομοκτόνα και τα βιολογικά μυκητοκτόνα αποτελούν τις κυριότερες ομάδες σε αντίθεση με τα βιολογικά ζιζανιοκτόνα που έχουν κυρίως παρουσία σε πειραματικό επίπεδο.

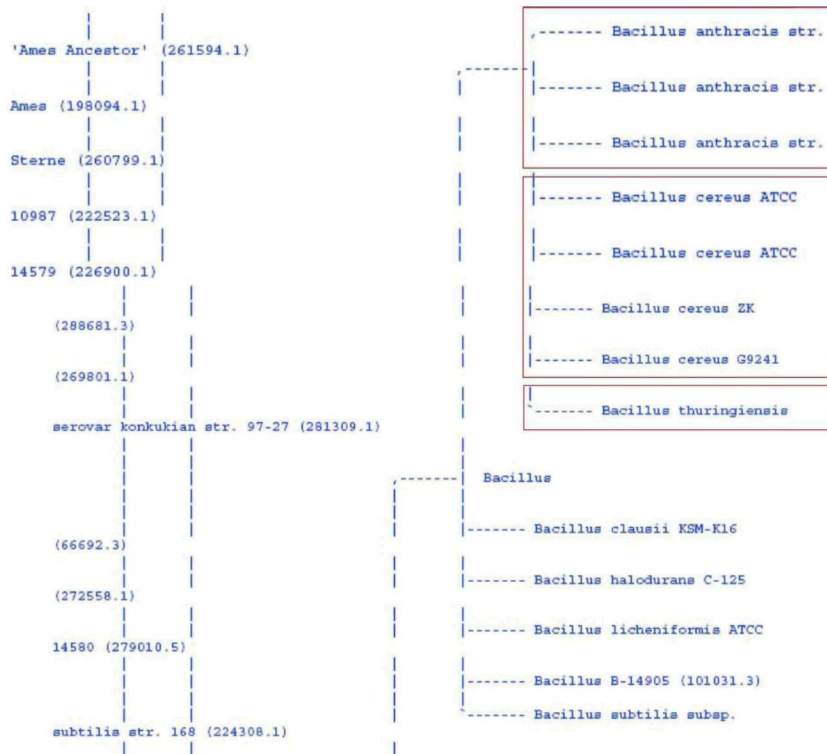
ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ

Τα βασικότερα βιολογικά εντομοκτόνα που κυκλοφορούν σήμερα στην παγκόσμια αγορά είναι

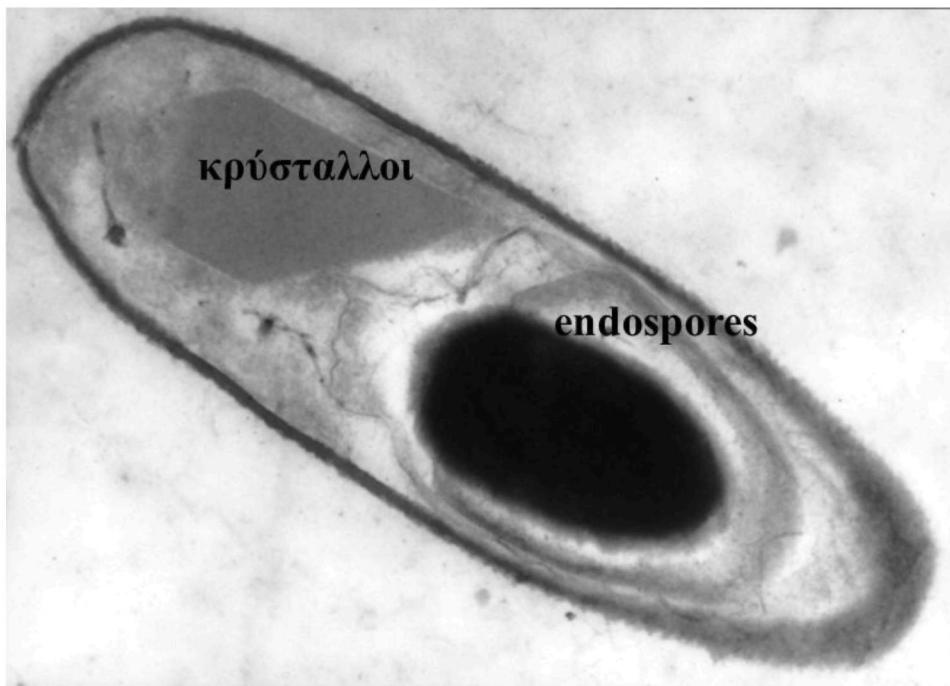
- *Bacillus thuringiensis*
- Βακιλοϊοί (Baculoviruses)
- Εντομοπαθογόνοι μύκητες
- Εντομοπαθογόνοι νηματώδεις

Bacillus thuringiensis: Αποτελεί την ναυαρχίδα των βιολογικών εντομοκτόνων και καλύπτει μεγάλο κομμάτι της αγοράς αυτών χρησιμοποιούμενο τόσο σε συμβατικές όσο και σε βιολογικές καλλιέργειες. Το *B. thuringiensis* είναι βακτήριο εδάφους και απομονώθηκε από προσβεβλημένες προνύμφες εντόμων αποθηκευμένων δημητριακών στην περιοχή της Θουριγγίας στην Γερμανία.

Φυλογενετικά το *B. thuringiensis* είναι συγγενικό με είδη του γένους *Bacillus* που αποτελούν σοβαρά παθογόνα του ανθρώπου όπως το *B. anthracis* και το *B. cereus*. Το *B. anthracis* είναι υπεύθυνο για την πρόκληση της ασθένειας του άνθρακα ενώ το *B. cereus* είναι βακτήριο εδάφους και τροφίμων και προκαλεί διάρροια και στομαχικές διαταραχές.



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



Πως δρα το Bt: Η αλληλουχία των γεγονότων φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα

- 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 προσδέεται 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

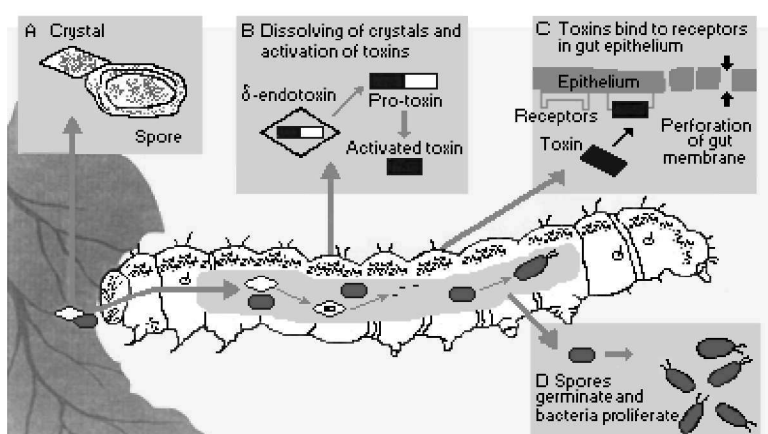


Fig. 1. Mechanism of toxicity of Bt

Από τότε έχουν απομονωθεί περισσότερα από 100 διαφορετικά στελέχη του *B. thuringiensis* καθένα με διαφορετικό φάσμα δράσης. Έτσι έχουν απομονωθεί στελέχη

- *B. thuringiensis* subsp. *Kurstaki* και *Aizawai* που παρουσιάζουν υψηλή αποτελεσματικότητα έναντι λεπιδοπτέρων
- *B. thuringiensis* subsp. *Tenebrionis* με δράση εναντίον κολεοπτέρων
- *B. thuringiensis* subsp. *Israelensis* με δράση εναντίον διπτέρων

Σήμερα στην αγορά κυκλοφορεί μεγάλος αριθμός σκευασμάτων του Bt όπως

- ***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%

Παρά την υψηλή αποδοχή του από την αγορά το Bt παρουσιάζει σημαντικά προβλήματα στην δράση και αποτελεσματικότητα του που αν επιλυθούν θα βοηθήσουν στην περαιτέρω αποδοχή του και από την συμβατική γεωργία. Τα προβλήματα αυτά είναι:

- Στενό φάσμα δράσης: Γενικά τα περισσότερα στελέχη που έχουν απομονωθεί μέχρι σήμερα παρουσιάζουν μια εκλεκτική δράση έναντι εντόμων συγκεκριμένων ομάδων κάτι που περιορίζει την ανταγωνιστικότητα τους σε σχέση με τα συνθετικά εντομοκτόνα που συνήθως παρουσιάζουν μεγαλύτερο 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: για μασητικά έντομα η καθυστερημένη θανάτωση του εντόμου μπορεί να είναι καταστροφική για την καλλιέργεια

Σήμερα με την βοήθεια της βιοτεχνολογίας γίνονται προσπάθειες ώστε να βελτιωθούν τα υπάρχοντα στελέχη Bt ώστε να διευρυνθεί το φάσμα δράσης τους και να επιφέρουν ταχύτατο θάνατο στο έντομο στόχο. Τα γονίδια που ελέγχουν την παραγωγή της δ-ενδοτοξίνης έχουν απομονωθεί, cpy γονίδια, και πραγματοποιούνται μελέτες για την παραγωγή ανασυνδυασμένων στελεχών με ικανότητα παραγωγής τοξινών με ευρύτερο φάσμα δράσης.

Βακιλοιοί: 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». Παρουσιάζουν στην εφαρμογή τους προβλήματα ανάλογα με αυτά που έχουν αναφερθεί για το Bt:

1. Στενό φάσμα δράσης: από γεωργικής άποψης το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό θα μπορούσε να θεωρηθεί μειονέκτημα από περιβαλλοντικής άποψης θεωρείται πλεονέκτημα καθώς τα στελέχη του ιού προσβάλουν μόνο

έντομα-στόχους χωρίς να έχουν την ικανότητα να προσβάλουν και ωφέλιμα έντομα

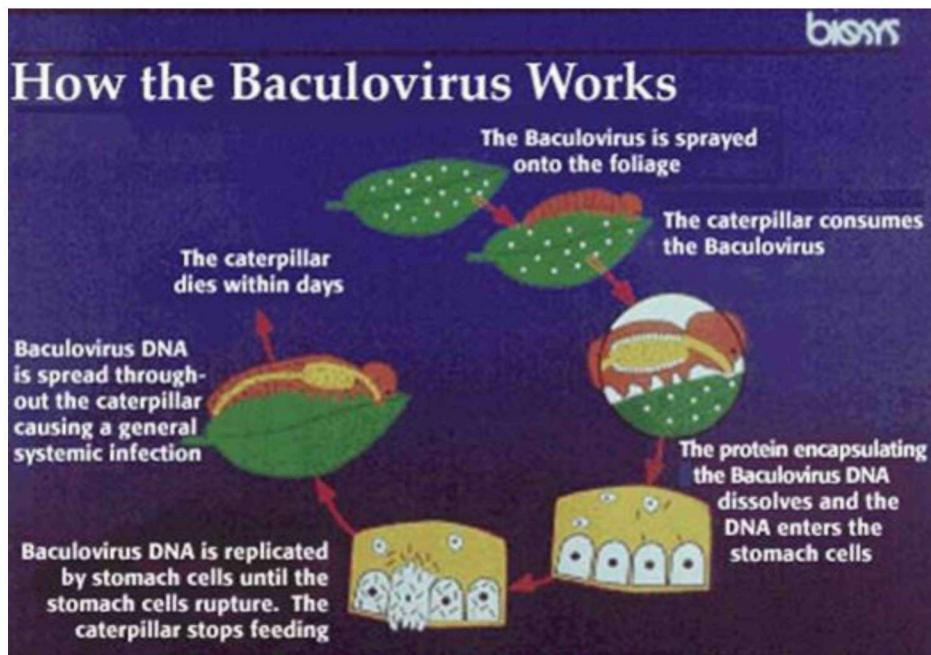
2. Έλλειψη τεχνολογίας για μαζική παραγωγή τους: Βασικότατο πρόβλημα αποτελεί η έλλειψη κυτταρικών σειρών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την μαζική παραγωγή των συγκεκριμένων εντομοπαθογόνων βακίλοιών
3. Αργό ρυθμό δράσης: Το πρόβλημα είναι ιδιαίτερα έντονο καθώς τα προσβεβλημένα έντομα έχει παρατηρηθεί ότι θανατώνονται μετά από αρκετές ημέρες και στο μεσοδιάστημα συνεχίζουν να διατρέφονται με υψηλούς ρυθμούς
4. Μικρή υπολειμματικότητα / ανθεκτικότητα στον αγρό: το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως μειονέκτημα από γεωργικής άποψης καθώς επιβάλλει την επαναλαμβανόμενη εφαρμογή του κατά την διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου αλλά από την άλλη περιβαλλοντικής άποψης θα μπορούσε να χαρακτηριστεί θεμιτό χαρακτηριστικό

Μέχρι σήμερα δύο είδη βακίλοιών έχουν αναπτυχθεί και αξιολογηθεί για την εντομοκτόνο δράση τους:

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

Οι NPVs είναι περισσότερο διαδεδομένοι λόγω της εύκολης απομόνωσης τους, της απλής και οικονομικής αναπαραγωγής τους στον ξενιστή και της εύκολης γενετικής τροποποίησης (διπλοελικομένο DNA αντί RNA)

Μηχανισμός Δράσης βακίλοιών: Τα στάδια του μηχανισμού δράσης των βακίλοιών φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα. Επιγραμματικά, οι βακίλοιοι εφαρμόζονται κυρίως ως υγρά σκευάσματα στα φύλλα και το έντομο που διατρέφεται στο φύλλο καταπίνει τον ιό. Η πρωτεϊνική κάψα των βακίλοιών 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



Αναγνωρίζοντας τα προβλήματα αποτελεσματικότητας των βακιλοϊών έχουν γίνει προσπάθειες για την γενετική βελτίωση των ήδη υπάρχοντων στελεχών ώστε

A) Να διευρύνουμε το φάσμα δράσης τους ώστε να προσβάλουν και άλλα έντομα: Ως προς αυτό το στόχο μελέτες έχουν εντοπίσει σε διάφορους βακιλοϊούς όπως ο *Autographa californica* και ο *Bombyx mori* γονίδια όπως τα p143, p35 και iap που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην επιλογή του ξενιστή από τον βακιλοϊό.

Ανασυνδυασμοί στα συγκεκριμένα γονίδια έχουν οδηγήσει σε πειραματικό επίπεδο σε επιλογή στελεχών με διευρυμένο φάσμα δράσης.

B) Να επιταχύνουμε την δράση του ώστε να προκαλεί άμεση θανάτωση των εντόμων που προσβάλουν: Προς αυτή την κατεύθυνση οι δοκιμές έχουν εστιαστεί στην ενσωμάτωση στο γονιδίωμα των βακιλοϊών γονιδίων που κωδικοποιούν εντομοκτόνες τοξίνες και δίνουν στους βακιλοϊούς άμεση εντομοκτόνο δράση. Τέτοιες τοξίνες είναι η δ-ενδοτοξίνη του Bt και η τοξίνη του σκορπιού που οδήγησαν σε σημαντική επιτάχυνση της θανάτωσης του εντόμου.

Το βασικό πρόβλημα με την χρήση των παραπάνω βελτιωμένων στελεχών είναι η μη αποδοχή τόσο σε επίπεδο κοινής γνώμης αλλά και σε επίπεδο ελεγκτικών αρχών χρήσης και ελευθέρωσης γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών.

Σήμερα στην Ελληνική αγορά υπάρχουν δύο σκευάσματα με έγκριση που περιέχουν βακιλοϊούς, τα Carponivusine® 1% και Madex® 1% που χρησιμοποιούνται ως υγρά εναιωρηματοποιήσιμα σκευάσματα για την καταπολέμηση της καρπόκαμιας σε οπωροφόρα δένδρα όπως μηλιά, αχλαδιά, κυδωνία.

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) των γενών *Steinernema* και *Heterohabditis* 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. Γενικότερα τα βακτήρια χρησιμοποιούν τους νηματώδεις ως όχημα ώστε να εισχωρήσουν στο εσωτερικό των νηματωδών και να αναπτυχθούν ενώ από την άλλη μεριά οι νηματώδεις χρησιμοποιούν τα βακτήρια για να ολοκληρώσουν τον βιολογικό τους κύκλο. Γενικά υπάρχει αυστηρή εκλεκτικότητα στην συμβίωση μεταξύ νηματωδών – βακτηρίων. Έτσι νηματώδεις του γένους *Steinernema* συμβιώνουν μόνο με βακτήρια του γένους *Xenorhabdus* και αντίστοιχα νηματώδεις του γένους *Heterohabditis* συμβιώνουν μόνο με βακτήρια του γένους *Photorhabdus*.

Σήμερα στην αγορά κυρίως των ΗΠΑ κυκλοφορεί μεγάλος αριθμός σκευασμάτων εντομοπαθογόνων νηματωδών και κάποια από αυτά παρουσιάζονται στο παρακάτω πίνακα

Εμπορικό όνομα	Νηματώδης
Nemasys II	<i>Heterohabditis magidis</i>
Biovector 355	<i>Steinernema ribobravivis</i>
Devour	<i>Steinernema ribobravivis</i>
Nemasys	<i>Steinernema feltiae</i>
Entonem	<i>Steinernema feltiae</i>
X-Gnat	<i>Steinernema feltiae</i>
Magnet	<i>Steinernema feltiae</i>
Gruiser	<i>Heterohabditis bacteriophora</i>
Heteromask	<i>Heterohabditis bacteriophora</i>

Τα συμβιωτικά βακτήρια του γένους *Xenorhabdus* και *Photorhabdus* αποτελούν πηγή παραγωγής τοξινών, ενζύμων και άλλων πρωτεϊνών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διάφορες βιομηχανικές εφαρμογές. Πιο συγκεκριμένα οι τοξίνες που παράγουν έχουν απομονωθεί σε καθαρή μορφή και σε *in vitro* πειράματα παρουσιάζουν πολύ υψηλή εντομοκτόνο δράση (πολύ υψηλότερη από δ-ενδοτοξίνη του Bt). Επίσης τα βακτήρια του γένους *Photorhabdus* παράγουν μια κρυσταλλική πρωτεΐνη που περιέχει ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις λυσίνης και μεθειονίνης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ιδιαίτερα θρεπτική ζωοτροφή

Τα γονίδια που κωδικοποιούν την παραγωγή των τοξινών από τα βακτήρια του γένους *Xenorhabdus* και *Photorhabdus* έχουν απομονωθεί και γίνονται προσπάθειες για την ενσωμάτωση τους σε καλλιεργούμενα φυτά για την παραγωγή GM φυτών που θα παράγουν τις τοξίνες αυτές. Τα γονίδια *xprt* 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.

Εντομοπαθογόνοι Μύκητες: Το μοναδικό ίσως αξιοπρόσεκτο παράδειγμα εντομοπαθογόνου μύκητα είναι ο *Beauveria bassiana*. Ένας ασκομύκητας που προσβάλλει διάφορα έντομα που προσβάλουν καλλιεργούμενα φυτά. Πρωτο-

απομονώθηκε το 1835 ως μύκητας που προσβάλλει τους μεταξοσκώληκες. Σήμερα χρησιμοποιείται ως εντομοκτόνο σε διάφορες καλλιέργειες (Φωτογραφία παρακάτω).



ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ

Τα βιολογικά μυκητοκτόνα περιλαμβάνουν σκευάσματα που περιέχουν μικροοργανισμούς οι οποίοι έχουν την ικανότητα μέσω συγκεκριμένων μηχανισμών να περιορίζουν την ανάπτυξη και προσβολή φυτών από φυτοπαθογόνους μύκητες. Τα βιολογικά μυκητοκτόνα διαχωρίζονται με βάση το είδος του φυτοπαθογόνου μύκητα που καταπολεμούν σε δύο κατηγορίες:

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

Βιολογικά μυκητοκτόνα εδάφους

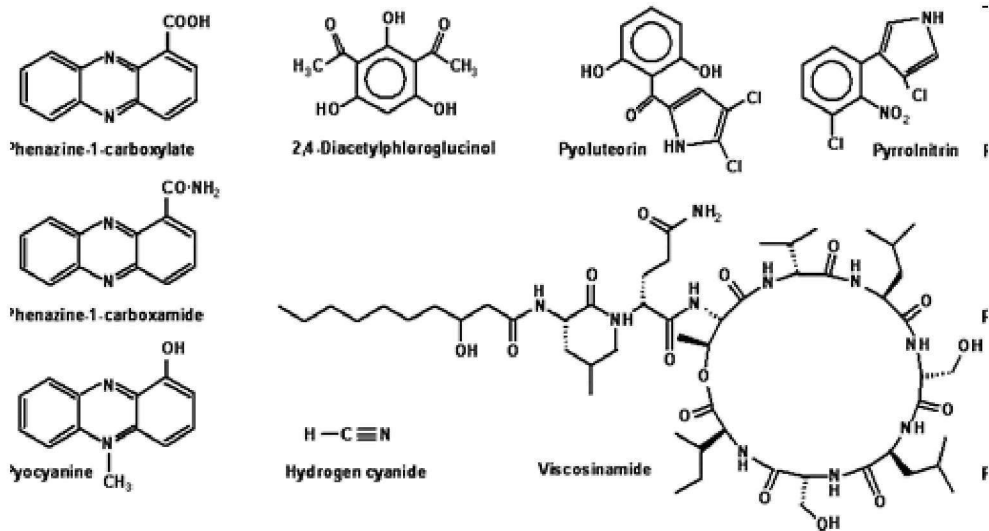
Η συγκεκριμένη κατηγορία αποτελεί και την πιο πολυπληθή ομάδα βιολογικών μυκητοκτόνων και περιλαμβάνει βακτήρια και μύκητες που διαβιούν στην ριζόσφαιρα και έχουν την ικανότητα με διάφορους μηχανισμούς να προστατεύουν τα φυτά από προσβολές από φυτοπαθογόνους μύκητες με έμμεσους ή άμεσους μηχανισμούς.

Οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί παρουσιάζουν διάφορους μηχανισμούς με τους οποίους καταπολεμούν τους φυτοπαθογόνους μύκητες όπως:

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

Ας δούμε όμως κατά σειρά του διάφορους μηχανισμούς δράσης των βιολογικών μυκητοκτόνων εδάφους με λεπτομέρεια και ανάλογα παραδείγματα

1. Παραγωγή αντιβιοτικών ουσιών: Κατά καιρούς έχουν απομονωθεί διάφοροι μύκητες και βακτήρια από την ριζόσφαιρα καλλιεργούμενων φυτών που έχουν την ικανότητα να παράγουν αντιβιοτικά με βιοκτόνο δράση κατά φυτοπαθογόνων μυκήτων και με αυτό τον τρόπο να προστατεύουν τα φυτά από εδαφογενής προσβολές. Τέτοια αντιβιοτικά είναι agrocin 84, agrocin 434 2,4-diacetylphloroglucinol, herbicolin, oomycin, phenazine, pyoluteorin pyrolnitrin (χημικές δομές επιλεγμένων αντιβιοτικών παρουσιάζονται ακριβώς παρακάτω)



Για να επιβεβαιωθεί η παραγωγή αντιβιοτικών ουσιών από συγκεκριμένους μικροοργανισμούς που παρουσιάζουν επισχετική δράση έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων εδάφους θα πρέπει να ακολουθηθούν συγκεκριμένα βήματα όπως

- Να απομονωθεί το αντιβιοτικό από *in vitro* καλλιέργειες του μικροοργανισμού και να εξεταστεί το φάσμα δράσης του *in vitro*
- Να δημιουργηθούν μεταλλάγματα που τους έχει αφαιρεθεί η ικανότητα παραγωγής του αντιβιοτικού και να εξεταστεί η επισχετική δράση τους έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων *in vivo*
- Να δημιουργηθούν μεταλλάγματα που υπερ-παράγουν το συγκεκριμένο αντιβιοτικό και να εξεταστεί η επισχετική δράση τους έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων *in vivo* (δες φωτογραφία παρακάτω)



Στην συγκεκριμένη φωτογραφία φαίνεται παρουσιάζεται *in vitro* η επισχετική δράση βακτηρίων έναντι επιλεγμένων φυτοπαθογόνων μυκήτων. Στις τέσσερις θέσεις περιμετρικά έχουν εμβολιαστεί βακτήρια προς αξιολόγηση της επισχετικής τους ικανότητας ενώ στο κέντρο του τριβλίου έχει εμβολιαστεί ο φυτοπαθογόνος μύκητας. Όπως φαίνεται τρία από τα βακτήρια που αξιολογούνται εμφανίζουν να περιορίζουν την ανάπτυξη του μυκηλίου του μύκητα περιμετρικά των αποικιών τους δίνοντας μια πρώτη απόδειξη για την επισχετική τους δράση.

2. 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. Χαρακτηριστικό παράδειγμα μικροοργανισμού που εμφανίζει τέτοια δράση είναι ένα γενετικά τροποποιημένο στέλεχος *Pseudomonas putida* από το οποίο είχε αφαιρεθεί η ικανότητα να παράγει σιδηροφόρες ουσίες. Το συγκεκριμένο στέλεχος 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.
3. Ανταγωνισμός για χώρο και θρεπτικά στοιχεία: Το περιβάλλον του εδάφους αποτελεί ένα ιδιαίτερα ολιγότροφο περιβάλλον με χαμηλή διαθεσιμότητα

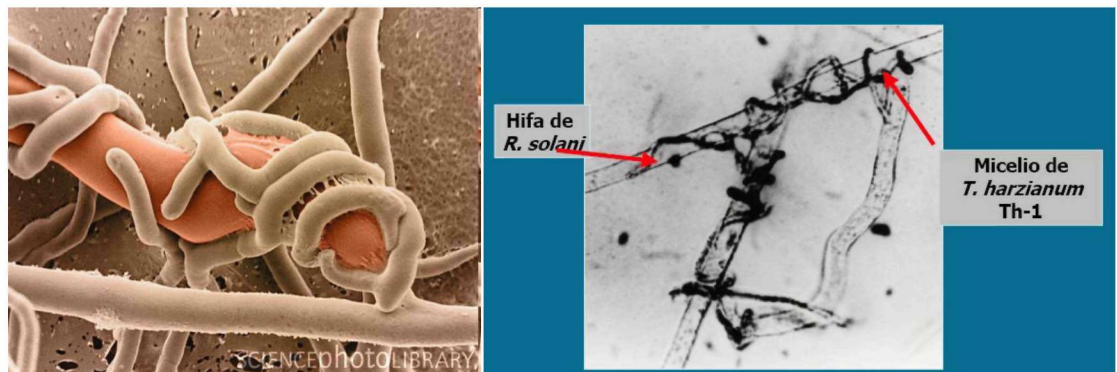
θρεπτικών ουσιών και υψηλό ανταγωνισμό μεταξύ των μελών της μικροβιακής κοινότητας ειδικότερα στην ριζόσφαιρα όπου το φυτό εκκρίνει μέσω της ρίζας του διάφορες ουσίες που αποτελούν εύκολα αφομοιώσιμες πηγές άνθρακα. Ορισμένοι μικροοργανισμοί της ριζόσφαιρας δρουν ως βιολογικά βιοκτόνα διαμέσου της ικανότητας τους να ανταγωνίζονται ιδιαίτερα αποτελεσματικά για χώρο και θρεπτικά στοιχεία στην ριζόσφαιρα εκτοπίζοντας τους πληθυσμούς των φυτοπαθογόνων. Το ιδιαίτερα εντυπωσιακό είναι ότι έχουν απομονωθεί στελέχη βακτηρίων ή μυκήτων του ανήκουν στο ίδιο γένος και είδος με φυτοπαθογόνα χωρίς όμως να παρουσιάζουν καμία φυτοπαθογόνο ικανότητα και τα οποία μπορούν να αποικήσουν την ριζόσφαιρα εις βάρος του φυτοπαθογόνου μικροοργανισμού. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν μη παθογόνα στελέχη *Pseudomonas syringae* τα οποία όταν εμβολιάστηκαν στην ριζόσφαιρα φυτών τομάτας μαζί με τα αντίστοιχα φυτοπαθογόνα στελέχη κατάφεραν να περιορίσουν σημαντικά την προσβολή των φυτών.

4. 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*). Οι μηχανισμοί άμυνας του φυτού που ενεργοποιούνται είναι:
 - Αυξημένη παραγωγή ενζύμων όπως χιτινάσες, υπεροξειδάσες, πολυφαινολικές οξειδάσες που καταλύουν τις κυτταρικές μεμβράνες των παθογόνων μυκήτων
 - Παραγωγή φυτοαλεξινών – τοξικές ουσίες με βιοκτόνο δράση
 - Εναπόθεση λιγνίνης ή φαινολικών στα επιδερμικά κύτταρα που έχουν προσβληθεί ώστε να περιοριστεί η περαιτέρω είσοδος του παθογόνου

5. 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. Βακτήρια που ανήκουν σε διάφορα είδη όπως *Burkholderia ceparacia*, *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.

6. Άμεσος παρασιτισμός επί των φυτοπαθογόνων μυκήτων: Διάφοροι μύκητες έχουν την ικανότητα να παρασιτούν τις μυκηλιακές υφές άλλων μυκήτων – φυτοπαθογόνων διαφόρων φυτών. Μύκητες του γένους *Trichoderma* παρασιτίζουν συχνά μυκηλιακές υφές διαφόρων φυτοπαθογόνων μυκήτων όπως *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* (φωτογραφία παρακάτω)



Στην παραπάνω φωτογραφία παρουσιάζονται φωτογραφίες από μικροσκόπιο όπου εμφανίζονται υφές του μύκητα *Trichoderma harzianum* να έχουν αναπτυχθεί επί του μυκηλίου του εδαφογενούς φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani*.

Βιολογικά Μυκητοκτόνα Φυλλώματος

Στην παγκόσμια αγορά κυκλοφορούν διάφορα εμπορικά σκευάσματα και περιέχουν σπόρια μυκήτων οι οποίοι παρουσιάζουν επισχετική δράση εναντίον φυτοπαθογόνων μυκήτων φυλλώματος. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιου βιολογικού μυκητοκτόνου αποτελεί το AQ10 που περιέχει σπόρια του μύκητα *Ampelomyces quisqualis* παρασιτίζει υφές και κονίδια των μυκήτων που προκαλούν την ασθένεια

ωίδιο (φωτογραφία παρακάτω)



Στην αριστερή φωτογραφία εμφανίζονται φυτά που έχουν προσβληθεί από ωίδιο ενώ δεξιά φαίνονται αντίστοιχα φύλλα επί των οποίων έχει γίνει εφαρμογή του AQ10