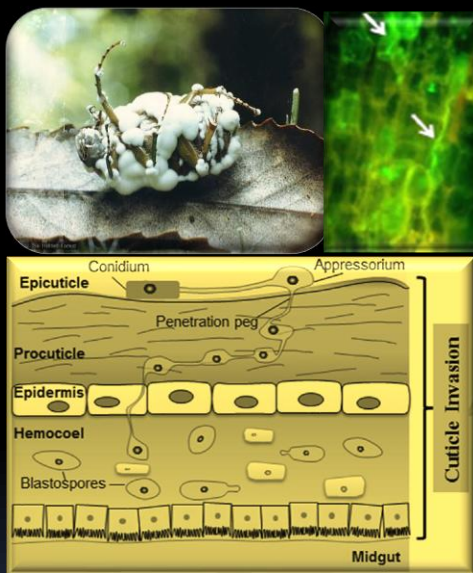




Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Βιολογίας
Τομέας Γενετικής & Βιοτεχνολογίας

Μ.Δ.Ε. «Οικολογία και Διαχείριση
της Βιοποικιλότητας»

Αξιοποίηση των εντομοπαθογόνων μυκήτων



Δρ. Βασίλης Κουβέλης
Αναπληρωτής Καθηγητής



✓ Τα «γεωργικά χημικά» (agricultural chemicals) ορίζονται ως χημικά όπως φυτοφάρμακα, ζιζανιοκτόνα, μυκητοκτόνα, εντομοκτόνα και λιπάσματα που χρησιμοποιούνται στη γεωργία για τον έλεγχο επιβλαβών οργανισμών και ασθενειών ή τον έλεγχο και την προώθηση της ανάπτυξης.

(Ramesh C. Gupta, James W. Crissman, in Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (3rd Edition), 2013)

✓ Τα «γεωργικά χημικά» (agricultural chemicals) μπορούν να διακριθούν σε 4 κατηγορίες:

- Ζιζανιοκτόνα
- Μυκητοκτόνα
- **Εντομοκτόνα**
- Τρωκτικοκτόνα



✓ Στόχος τους η προστασία των γεωργικών καλλιεργειών

(Ramesh C. Gupta, James W. Crissman, in Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (3rd Edition), 2013)



Schistocerca gregaria (Η ακρίδα της ερήμου): απρόβλεπτη, καταστροφική, με δυνατότητα επανεμφάνισης μετά από πολλά χρόνια

Worst historical pest - the desert locust

Schistocerca gregaria: a pest since biblical times, they fly in unexpectedly, strip a field bare in an hour and consume a very wide range of crops.

Locust swarms may vanish for many years, only to break out of their endemic regions after periods of abnormally high rainfall.

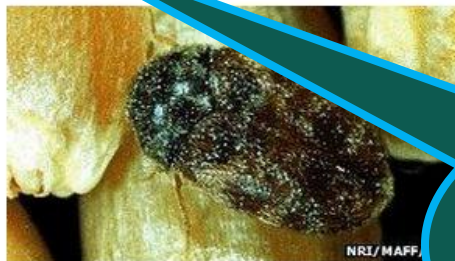


Worst stored product pest - the Khapra beetle

This insect, *Trogoderma granarium*, is difficult to control because it feeds on a variety of dried materials.

It is resistant to insecticides and can go **long periods without food**.

Infestations can result in up to 70% grain damage, making products inedible and unmarketable.



Most resilient pest - colorado potato beetle

Leptinotarsa decemlineata is a strong candidate for this award, having managed in the space of about 50 years to develop resistance to 52 different compounds belonging to all major insecticide classes (including cyanide).

This beetle therefore has effectively beaten the chemists.



Leptinotarsa decemlineata («σκαθάρι της πατάτας»): ανθεκτικό - σε 50 χρόνια ανθεκτικότητα σε 52 διαφορετικά εντομοκτόνα

Trogoderma granarium («σκαθάρι της ντουλάπας»): ανθεκτικό - ποικιλία ξηράς τροφής, χωρίς τροφή για μεγάλους περιόδους - 70% καταστροφές



Το 2012 αποτελούσαν το 50% των χημικών ζιζανιοκτόνων (εντομο-, μυκητο- κ.λπ)
Από το 2001 η EPA (Environmental Protection Agency) **απαγόρευσε** τη χρήση τους σε **κατοικημένες περιοχές**, **ΑΛΛΑ** συνεχίζεται η χρήση τους **ως παρασιτοκτόνα στη γεωργία**

Γιατί;

Καρκινογόνα, τοξικά, καρδιοαγγειακά και αναπνευστικά προβλήματα, πρόωρες αποβολές, νευρικής φύσης προβλήματα σε νεογνά.

Παρόλου που διασπώνται γρήγορα από το φως και τον αέρα, ίχνη τους έχουν βρεθεί σε πόσιμο νερό και φαγητά!





Οι Βιολογικοί Παράγοντες Ελέγχου (Biological Control Agents - BCAs)

1. Οι Θηρευτές (predators)

Οι θηρευτές είναι κυρίως ελεύθερα ζωντανά (free-living) είδη που καταναλώνουν άμεσα μεγάλο αριθμό θηραμάτων καθόλη τη διάρκεια της ζωής τους



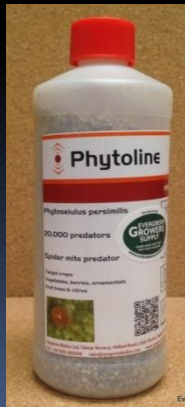
Ακάρεα όπως το
Phytoseiulus persimilis



Έντομα όπως η
πασχαλίτσα (*Coccinella
magnifica*)



Νηματώδη όπως το
νηματώδες
*Phasmarhabditis
hermaphrodita*





Οι Βιολογικοί Παράγοντες Ελέγχου (Biological Control Agents - BCAs) 2. Οι παρασιτοειδείς (parasitoids):

Οι παρασιτοειδείς τοποθετούν τα αυγά τους πάνω ή μέσα στο σώμα ενός εντόμου – ξενιστή, ο οποίος στη συνέχεια χρησιμοποιείται ως τροφή για την ανάπτυξη των προνυμφών. Ο ξενιστής τελικά σκοτώνεται.



Χαλκικοειδής σφήκα
όπως η *Encarsia formosa*



Μύγα της οικογένειας
Tachinidae όπως η
Tachina fera





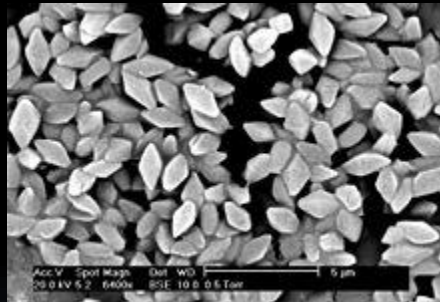
Οι Βιολογικοί Παράγοντες Ελέγχου (Biological Control Agents - BCAs)

3. Οι παθογόνοι (pathogens):

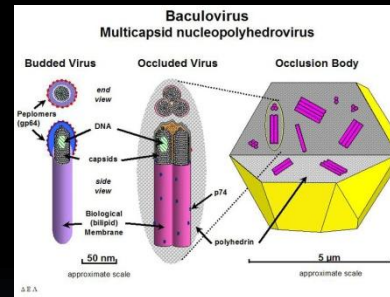
Συνήθως μικροοργανισμοί που καταστρέφουν ή αποδυναμώνουν τον ξενιστή τους και είναι σχετικά ειδικοί ως προς τον ξενιστή. Διάφορες μικροβιακές ασθένειες εντόμων εμφανίζονται στη φύση, αλλά μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικά παρασιτοκτόνα.



Μύκητες όπως το
*Metarhizium
anisopliae*



Βακτήρια όπως ο
Bacillus thuringiensis



Ιοί όπως ο *Lymantria
dispar multicapsid
nuclear polyhedrosis
virus*



Ωομύκητες όπως ο
Lagenidium giganteum



Παθογόνοι (pathogens) :

Συνήθως μύκητες που καταστρέφουν ή αποδυναμώνουν τον ξενιστή τους και είναι σχετικά ειδικοί ως προς τον ξενιστή.

Στα έντομα



όπως το
*Metarhizium
brunneum*

Εντομοπαθογόνοι

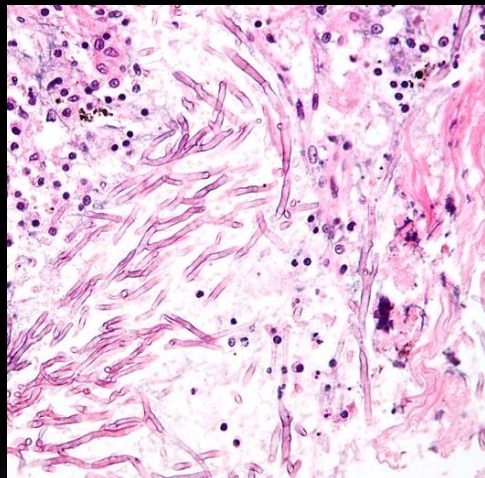
Στα φυτά



όπως η
*Magnaporthe
oryzae*

Φυτοπαθογόνοι

Στον άνθρωπο



όπως ο *Aspergillus
fumigatus*

Παθογόνοι στον
άνθρωπο

Σε άλλους μύκητες



όπως το
*Cladobotryum
mycophilum*

Μυκητόφιλοι

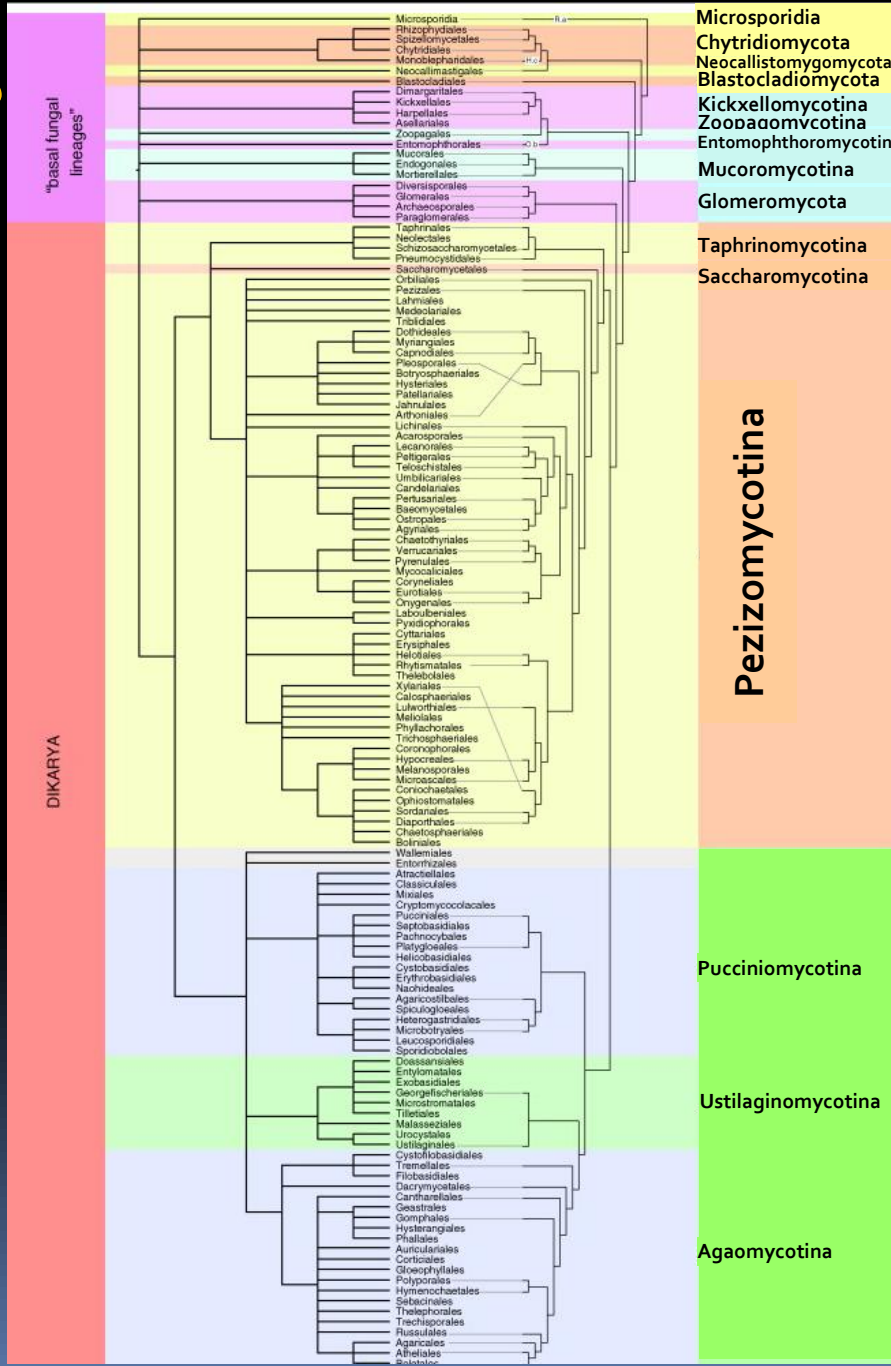


Ταξινόμηση των μυκήτων

Γενικά

Basal
Fungal
Lineages

Dikarya



Chytrids

"Zygomycetes"

Ascomycota

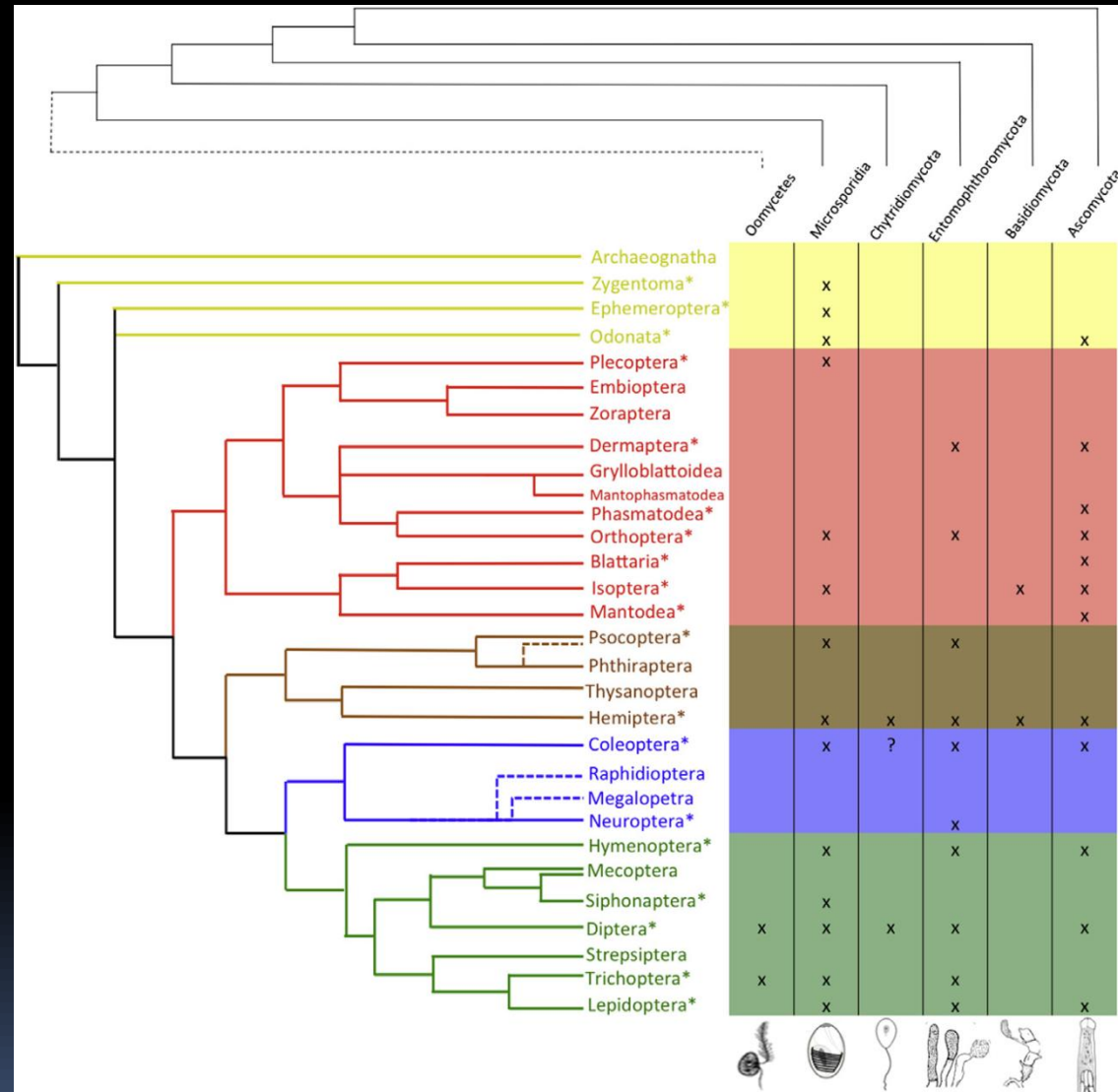
Basidiomycota

McLaughlin et al 2009 -
Trends Microbiol. 17:
488-497



Οι **μύκητες** που **παρασιτούν**
(και **τρέφονται**) από τα
έντομα

Ανήκουν στα Φύλα των:
Μικροσποριδίων,
Χυτριομυκήτων (εξαιρετικά
σπάνια), «Ζυγομύκητες»
(Entomophthoromycota),
Βασιδιομυκήτων (σπάνια,
ανήκουν Septobasidiales) και
Ασκομυκήτων



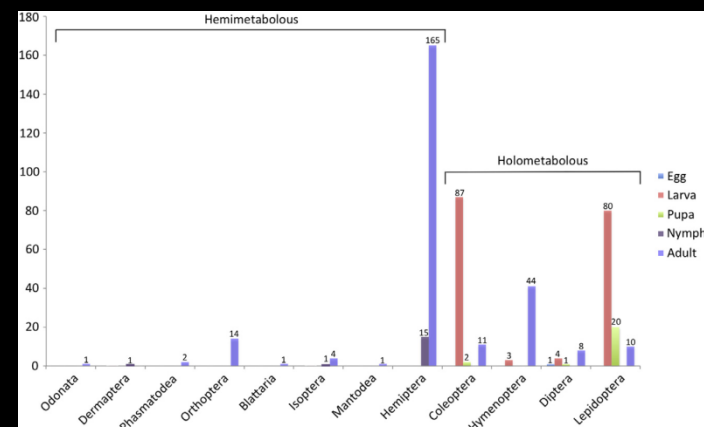
Araujo J.P.M. and Hughes, D.P. 2016. In "Genetics and Molecular Biology of Entomopathogenic Fungi"
(Eds. B. Lovett and R.J. St Leger) Elsevier, Fig. 5





Κύρια γένη που έχουν χρησιμοποιηθεί ήδη εμπορικά:

Araujo J.P.M. and Hughes, D.P. 2016. In "Genetics and Molecular Biology of Entomopathogenic Fungi" (Eds. B. Lovett and R.J.St Leger) Elsevier, Fig. 3

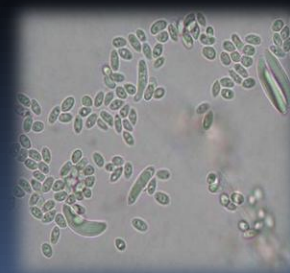
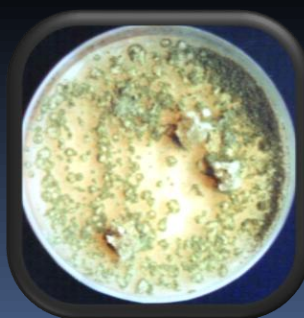


Metarhizium

(Hypocreales, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota)

9 είδη ανήκουν σε αυτό το γένος με κυριότερους αντιπροσώπους

Metarhizium anisopliae, *M. brunneum*, *M. robertsii*.





Πρόσφατη επαναθεώρηση της ταξινομικής του *Verticillium lecanii* οδήγησε στην εισαγωγή του γένους:

Lecanicillium

(Hypocreales, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota)

8 είδη ανήκουν σε αυτό το γένος με κυριότερους αντιπροσώπους

L. muscarium (Mycotal) – Αφίδες & Εύκρατα κλίματα

Akanthomyces lecanii (*L. lecanii*) (Vertalec)– «μαλακά» σκαθάρια (*Coccidae* or *Lecanidae*) & τροπικά κλίματα





Beauveria

(Hypocreales, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota)

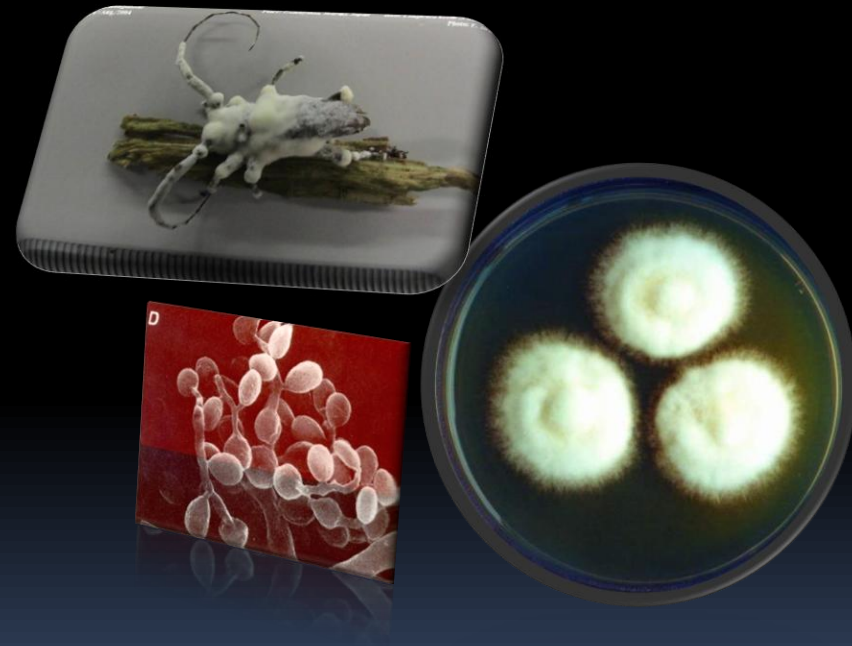
Τουλάχιστον 49 είδη -

Κύριοι αντιπρόσωποι *B. bassiana* and *B. brongniartii*.

B. bassiana



B. brongniartii





Beauveria

Αμερική: 16 στελέχη με ξενιστές Lepidoptera, Coleoptera, Orthoptera, Arachnids και χώμα

Ευρώπη: 45 στελέχη με ξενιστές Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Orthoptera, Thysanoptera, Hymenoptera, Arachnids και χώμα

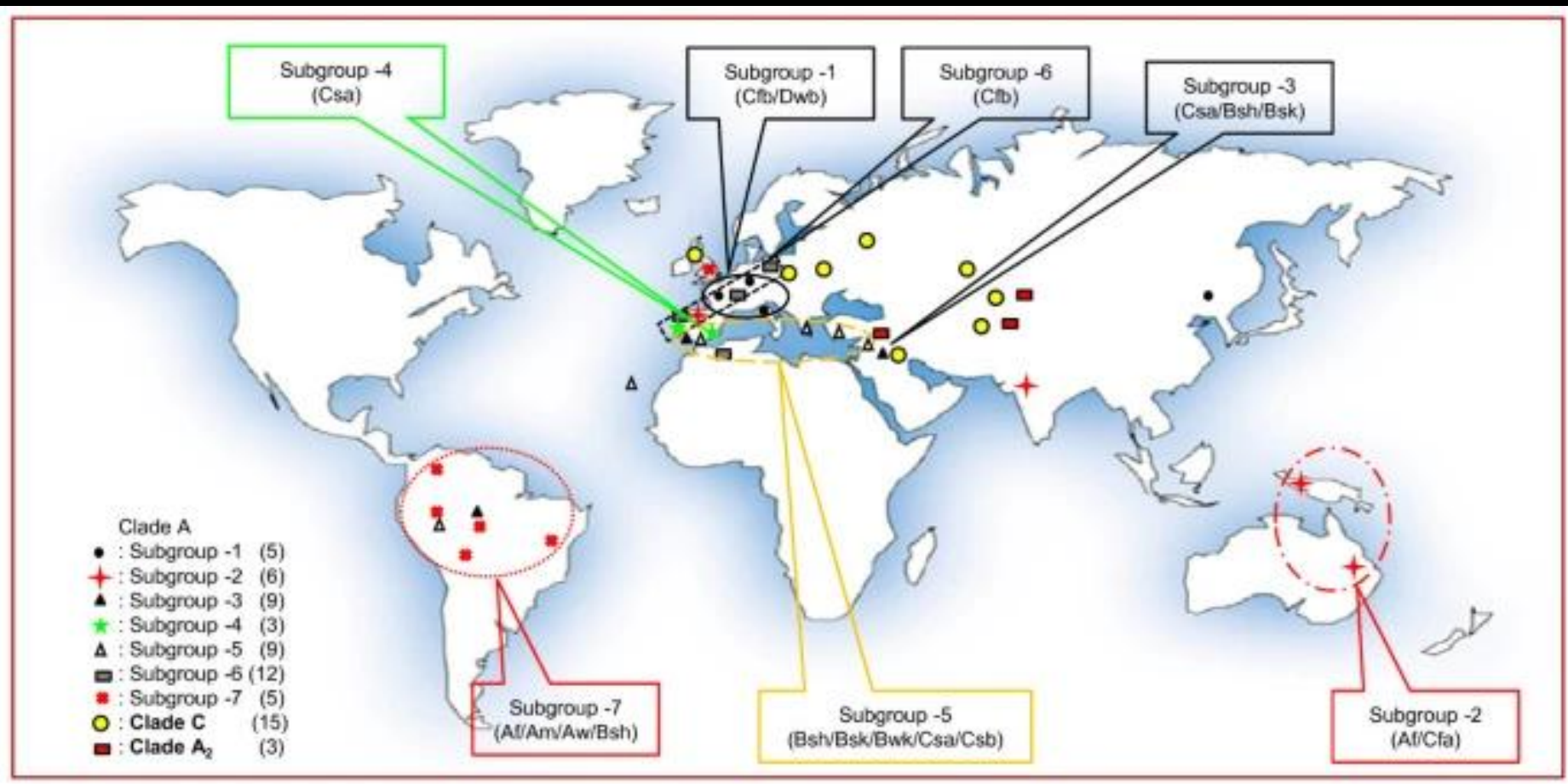
Αφρική: 3 στελέχη με ξενιστές Coleoptera και χώμα

Ασία-Αυστραλία: 12 στελέχη με ξενιστές Coleoptera, Hemiptera, Lepidoptera και χώμα

Συνολικά **93** στελέχη, εκ των οποίων **76** *Beauveria bassiana*, **11** στελέχη από είδη που ανήκουν στο γένος *Beauveria* και τα υπόλοιπα από την Τάξη Hypocreales.

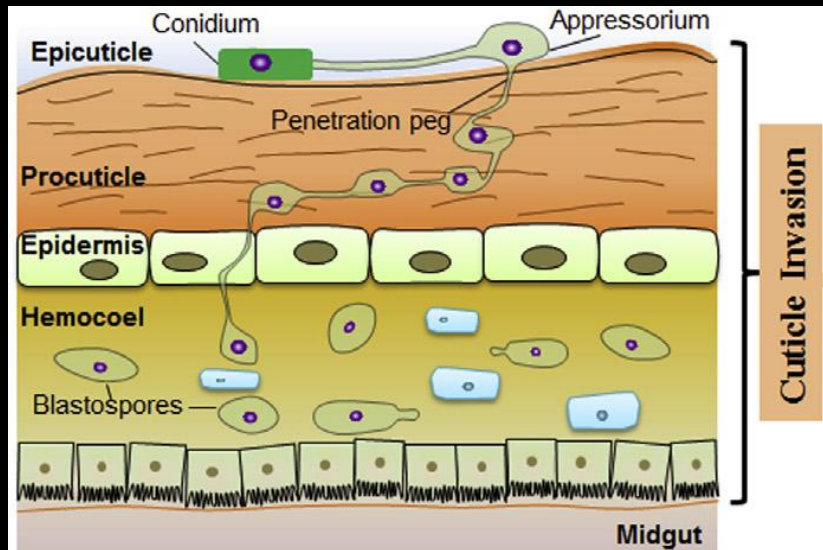


Beauveria



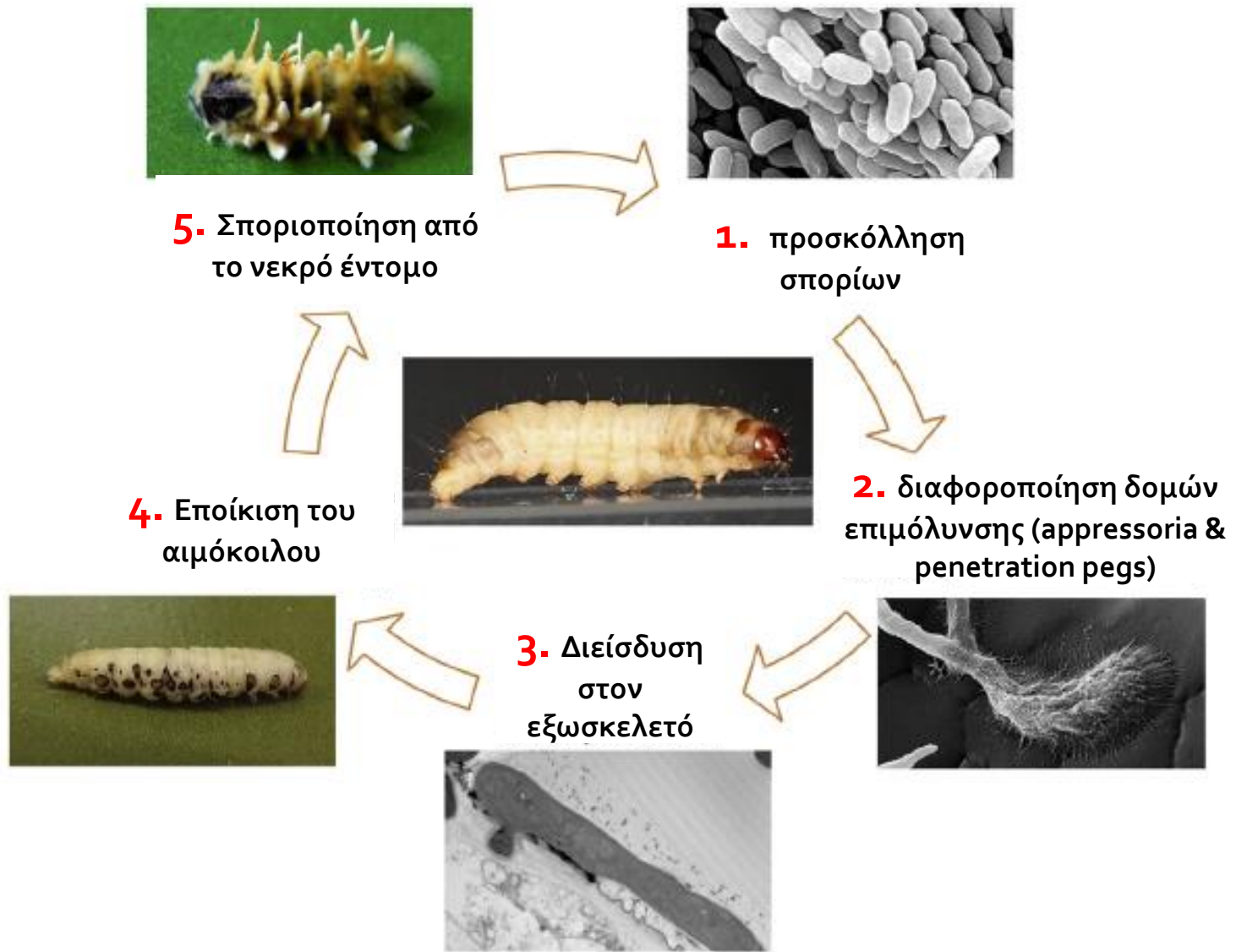


Zhao H., Lovett B. and Fang, W. 2016. In "Genetics and Molecular Biology of Entomopathogenic Fungi" (Eds. B. Lovett and R.J.St Leger) Elsevier, Fig. 1



Αρχικοί Μηχανισμοί άμυνας ξενιστή έναντι EPF:

1. Προσπάθεια εντοπισμού μύκητα μέσω οσμής (π.χ. ο τερμίτης *Macrotermes michaelsei* διακρίνει μολυσματικούς ή μη *M. anisopliae* & *B. bassiana* μέσω VOCs)
2. Αλλαγή της συμπεριφοράς τους (π.χ. Οι εργάτες του είδους *Formica selysi* αυτοξεσκονίζονται με φορμικό οξύ ή AMPs – Antimicrobial peptides μέσω του σάλιου τους ή άλλων εκκρίσεων από αδένες στο θώρακα)
3. Απομάκρυνση μολυσμένων ατόμων μακριά από φωλιά
4. Με προφύλαξη μέσω υπερπληθυσμού και συνωστισμού – ενεργοποίηση ανοσοποιητικού τους συστήματος αντί περισσότερους θανάτους
5. Προσέλκυση σπορίων για «αυτο-εμβολιασμό» (αντιφατική προσέγγιση)



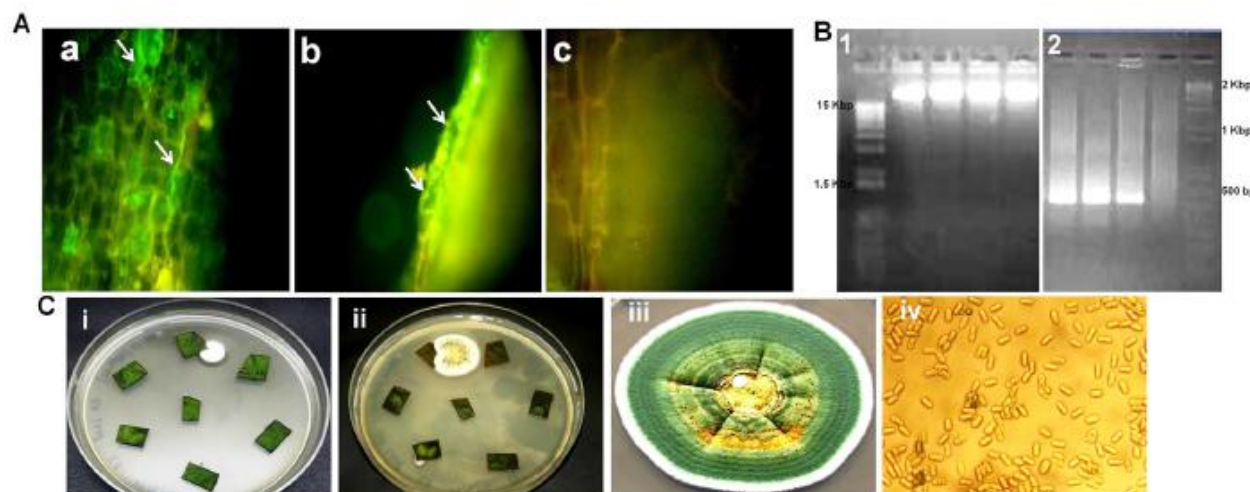


FIGURE 3 *Metarhizium* isolates can be established as endophytes in *A. squamosa* plants. (A) FITC-WGA stained cross-sections of *A. squamosa* plant parts inoculated with *M. anisopliae* MCC1192: a. leaves; b. roots; c. un-inoculated control. The presence of fungal hyphae (*M. anisopliae* MCC1192) is indicated by arrows. (B) 1. Agarose gel electrophoresis of total genomic DNA isolated from *A. squamosa* leaves inoculated with (2nd well from left and onwards) MCC1192, MCC1197, positive control (MCC1192 genomic DNA) and control (un-inoculated). In the 1st well, DNA ladder (1 Kb plus, Thermo Scientific, India), was loaded. 2. Agarose gel electrophoresis of total genomic DNA challenged with fungal specific ITS1 and ITS4 primers (an amplicon of ~500 bp). 1st well from left and onwards, MCC1192, MCC1197, positive control (MCC1192 genomic DNA) and control (un-inoculated). In the last well, 100 bp DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, India) was loaded. (C) *M. anisopliae* strain MCC1192, established as an endophyte in *A. squamosa* leaves: (i) appearance of an endophyte after 14 d; (ii) sporulated growth; (iii) pure colony; and (iv) typical spores of strain MCC1192 (400x under light microscope)

Received: 8 November 2018 | Revised: 17 January 2019 | Accepted: 25 January 2019
DOI: 10.1002/jbm.201800631



RESEARCH PAPER

Journal of Basic Microbiology

The puzzle of highly virulent *Metarhizium anisopliae* strains from *Annona squamosa* fields against *Helicoverpa armigera*

Ejaz K. Pathan | Mukund V. Deshpande

Αννώνη η φολιδωτή, Γλυκόμηλο (*Annona squamosa*)

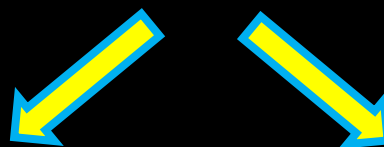
Από Muhammad Mahdi Karim

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=9116065>



Εντομοπαθογόνοι (EPF) προς ενδοφυτισμό;

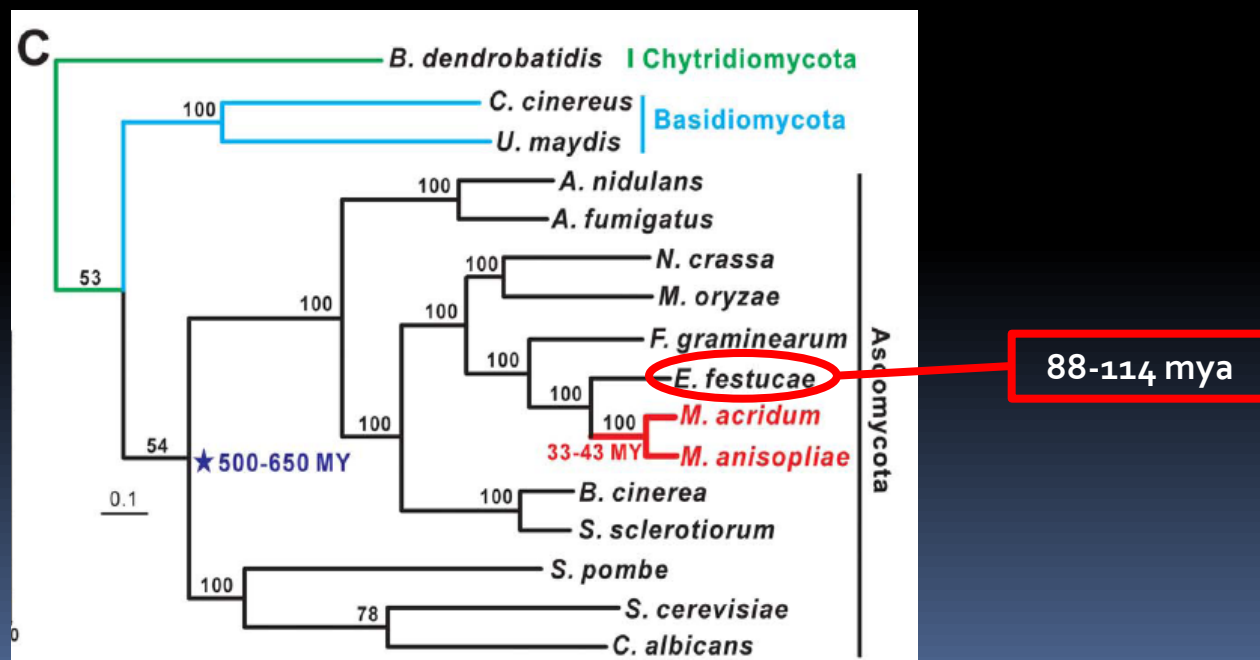
Γονίδια



«Υιοθετημένα»

Πολυ-λειτουργικά

EPF συγγενικά με είδη ενδοφυτικά όπως *Claviceps* και *Erichloë*





Εντομοπαθογόνοι (EPF) προς ενδοφυτισμό;

Γονίδια  Πολυ-λειτουργικά

mad1 & *mad2* κωδικοποιούν πρωτεΐνες προσκόλλησης είτε σε εξω-επιδερμίδιο εντόμου είτε σε ρίζες φυτού

Pr1 πρωτεάση που χρησιμοποιείται τόσο σε έντομα όσο και σε φυτά

Μήπως λοιπόν EPF προήλθαν από αρχέγονους φυτο-παθογόνους προγόνους;

Αν ναι τότε πως εμφανίστηκαν τα γονίδια που είναι εξειδικευμένα για έντομα;

atl1 για πρωτεάση που στοχεύει κυτταρικό τοίχωμα φυτού στο ενδοφυτικό μύκητα *Acremonium typhinum*. Ομόλογα γονίδια τόσο στα EPF ενδόφυτα *B. bassiana* & *M. anisopliae* όσο και στο μυκοπαρασιτικό *Trichoderma harzianum* και παθογόνο σε νηματώδη *Arthrobotrys oligospora* που επίσης είναι ενδόφυτα.



ΑΡΑ : μήπως αρχέγονη «ενδοφυτική» πρωτεάση?????

Μηχανισμοί απόκτησης αντ/χων γονιδίων με εξειδικευμένη δράση:

- Διπλασιασμός και επακόλουθη εξειδίκευση δράσης
- Φαινόμενα Οριζόντιας Μεταφοράς (HGT)



Meta-analysis of the role of entomopathogenic and unspecialized fungal endophytes as plant bodyguards

2002 *New Phytologist* (2019) 223: 2002–2010
www.newphytologist.com

Alan C. Gange¹ , Julia Koricheva¹ , Amanda F. Currie¹, Lara R. Jaber²  and Stefan Vidal³ 

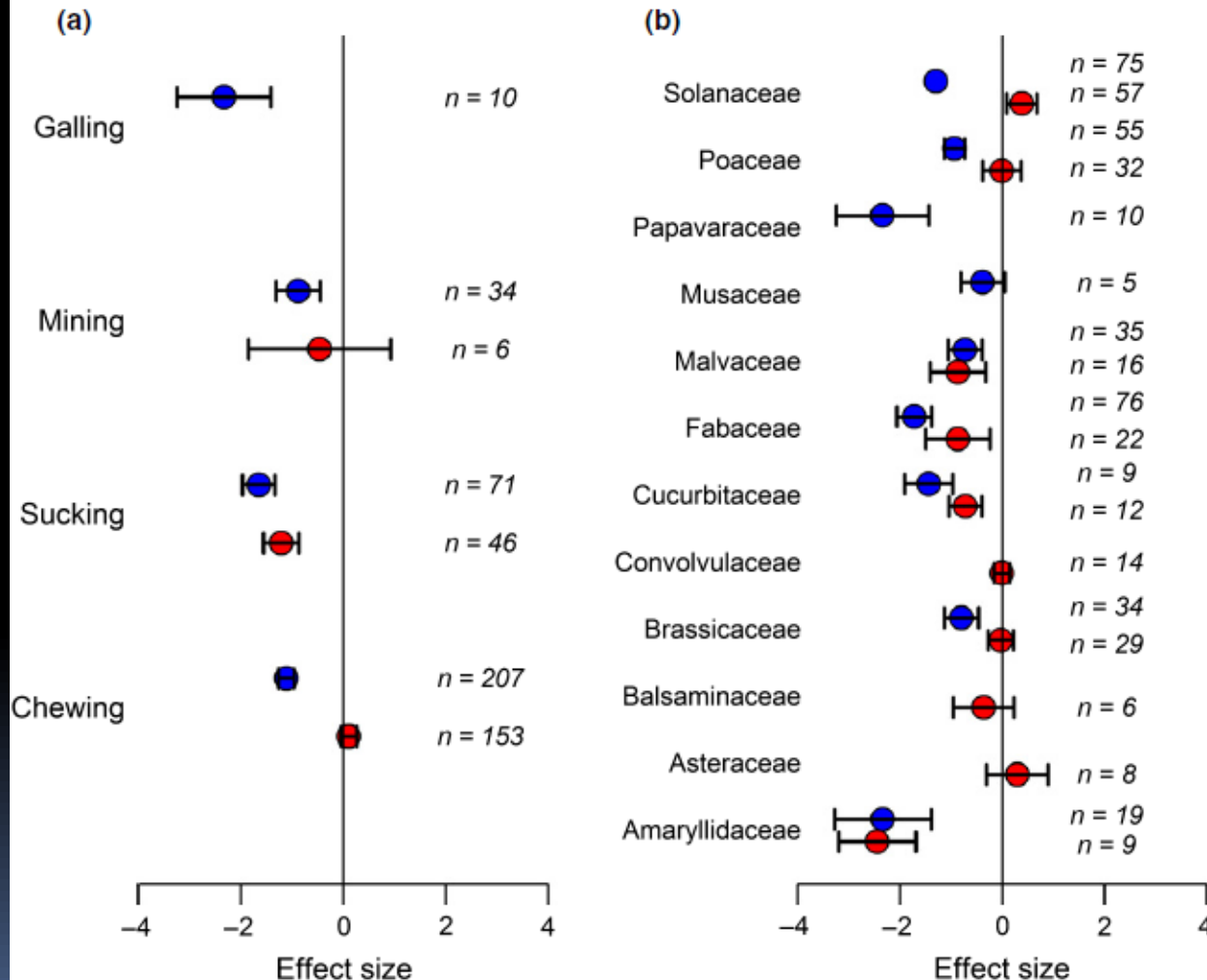


Fig. 3 (a) Endophytic entomopathogens (blue symbols) reduced the growth of all insect feeding guilds, whereas effects of nonentomopathogens (red symbols) were seen only in sucking insects. (b) Effects of both entomopathogens and nonentomopathogens vary according to plant family. Values are mean effect size (Hedges' *d*) and negative values mean that the presence of the fungi reduces insect performance. Error bars represent 95% confidence intervals, and effect size is considered significant when these do not overlap zero (vertical line); *n* denotes number of effect sizes for each group.

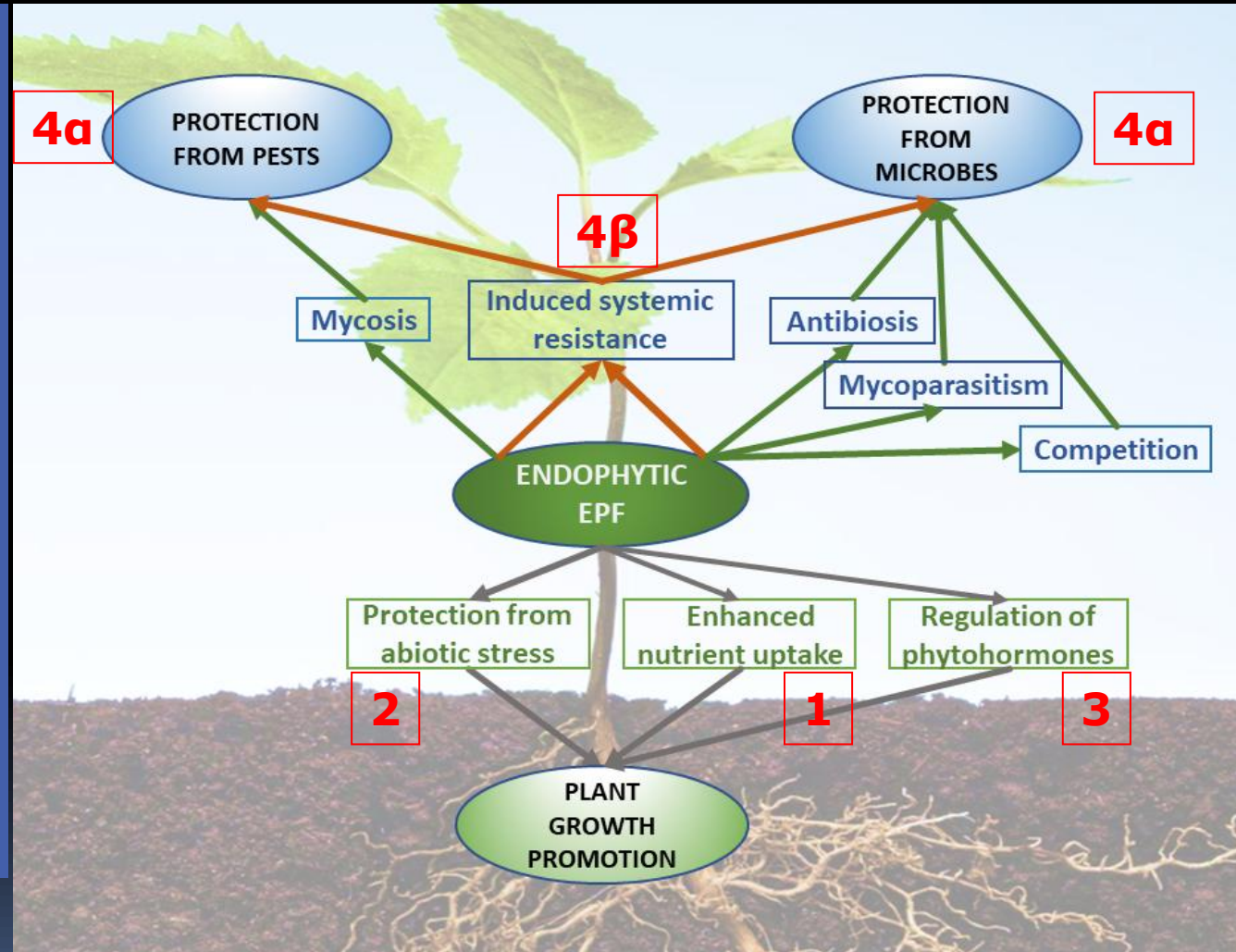


Daktulosphaira vitifoliae
(φυλλοξέρα)



Γιατί οι μύκητες αυτοί να έχουν διττό ρόλο ως ενδοφυτικοί και εντομοπαθογόνοι;

1. Ανάκτηση αζώτου
2. Προστασία από αβιοτικούς στρεσογόνους παράγοντες π.χ. pH, θ
3. Ρύθμιση φυτοορμονών
4. Άμυνα (α) άμεση (β) έμμεση





1. Επηρεασμός στην ανάπτυξη των φυτών

Πειραματικά δεδομένα:

Metarhizium spp & *Beauveria bassiana* σε φυτά όπως ντομάτα, καλαμπόκι, πατάτα και φασολιά.

Μηχανισμοί:

α) συνεισφορά στην αύξηση θρεπτικών συστατικών από το χώμα κάτω από στρες (ξηρασία, έλλειψη θρεπτικών) - π.χ. άζωτο από τα νεκρά έντομα

β) παραγωγή φυτοορμονών (π.χ. αυξίνης - IAA) ή ρύθμιση (επαγωγή αυτών)

γ) μέσω παραγωγής πτητικών οργανικών ενώσεων.





2-3. Προστασία ενάντια σε αβιοτικούς στρεσογόνους παράγοντες / παραγωγή φυτοορμονών

Πειραματικά δεδομένα:

Metarhizium spp & *Beauveria bassiana* σε φυτά όπως ντομάτα, καλαμπόκι, πατάτα και φασολιά - Αντοχή στην ξηρασία, υψηλές θερμοκρασίες, αλατότητα.

Μηχανισμοί:

α) Παραγωγή γιβεριλλινών και μείωση του αψιδικού οξέος για την αντιμετώπιση αυξημένης αλατότητας

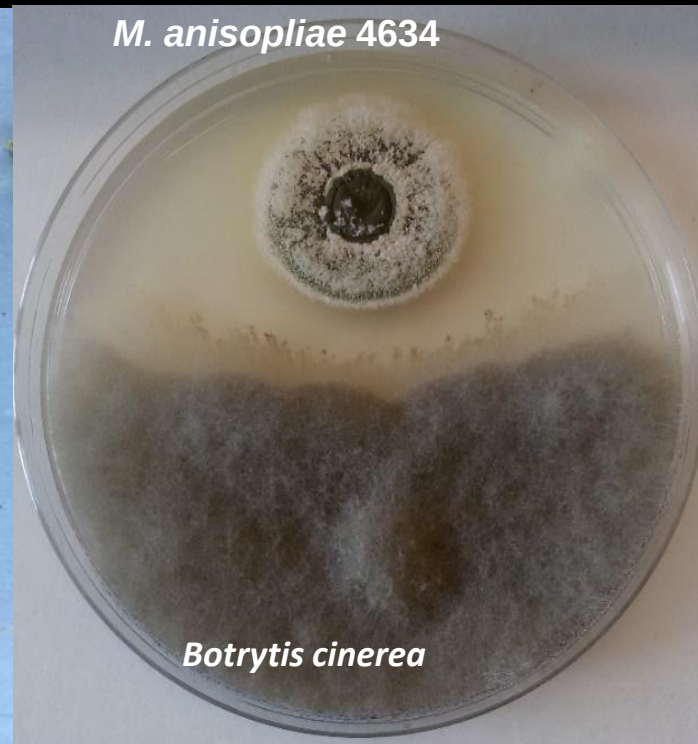
β) σε έλλειψη σιδήρου συμβάλλουν στην παραγωγή περισσότερης χλωροφύλλης



4. Προστασία ενάντια σε βιοτικούς επιβλαβείς παράγοντες

Πειραματικά δεδομένα:

Metarhizium spp & *Beauveria bassiana* σε φυτά όπως ντομάτα, αγγουριά, πιπεριά και βαμβάκι - ενάντια σε φυτοφάγα παράσιτα, φυτοπαρασιτικούς μύκητες (π.χ. *Fusarium*), βακτήρια (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malcearum*) ιούς (*Zucchini yellow mosaic virus*).





4. Προστασία ενάντια σε βιοτικούς επιβλαβείς παράγοντες

Μηχανισμοί: ΠΑΡΑΓΩΓΗ 2γενών μεταβολιτών που

α) προωθούν ανταγωνισμό

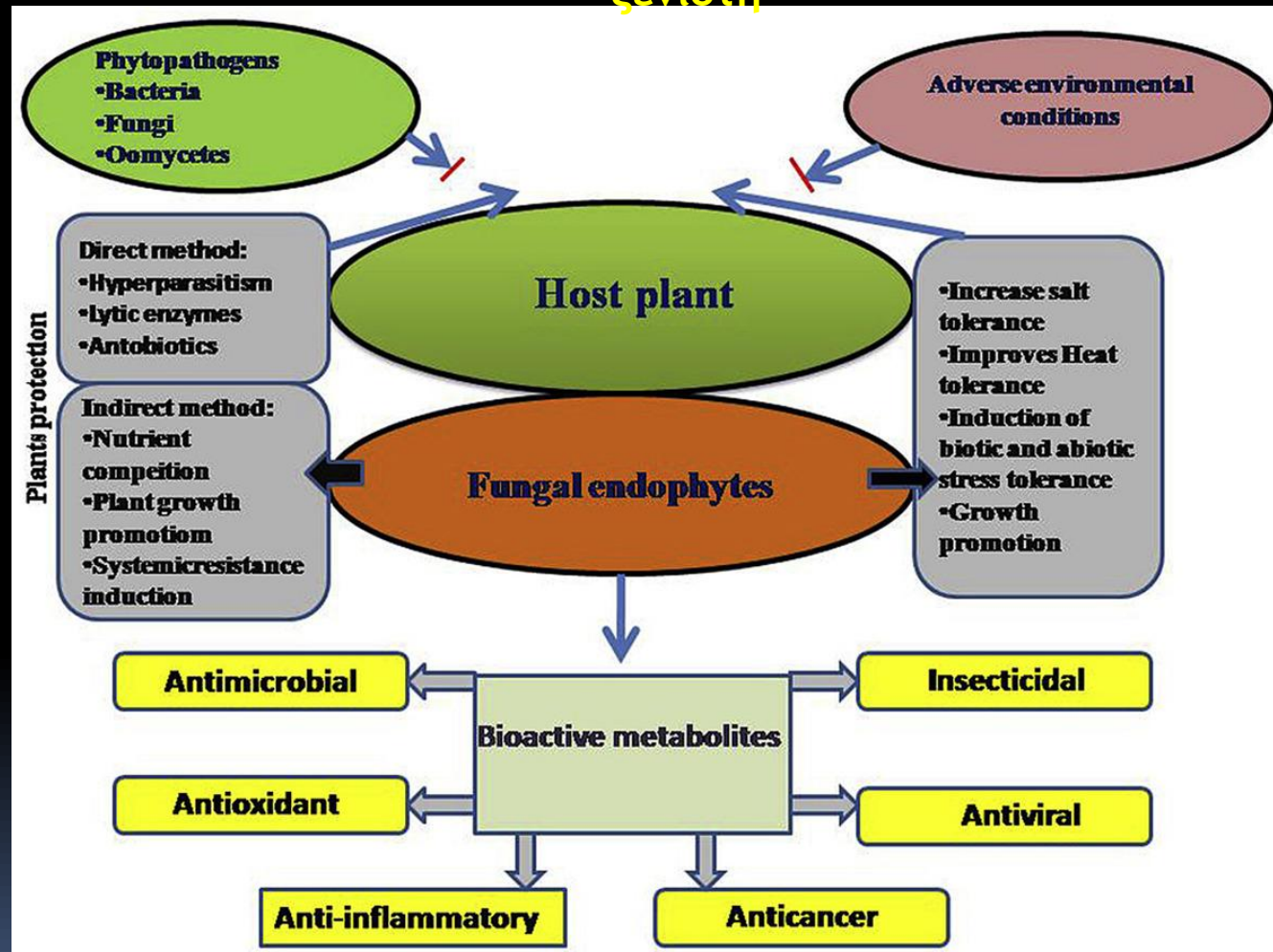
β) έχουν αντιμικροβιακή δράση, π.χ. Αντιβιοτικά ή κυτταροτοξική δράση

γ) επάγουν την συστηματική αντίσταση του φυτού (*induced Systemic Response - ISR*) μέσω ενεργοποίησης των μεταβολικών μονοπατιών του *Jasmonic acid (JA)* και του *αιθυλενίου (ET)*

δ) επάγουν την συστηματική επίκτητη αντίσταση (*systemic acquired Resistance - SAR*) μέσω των μεταβολικών μονοπατιών του σαλικυλικού οξέος και των γονιδίων παθογένεσης όπως χιτινάσες γλουκανάσες κλπ



Οι τρόποι δράσης και οι ρόλοι των ενδοφυτικών (εντομοπαθογόνων) μυκήτων όταν βρίσκονται εντός του φυτού - ξενιστή





Definition:

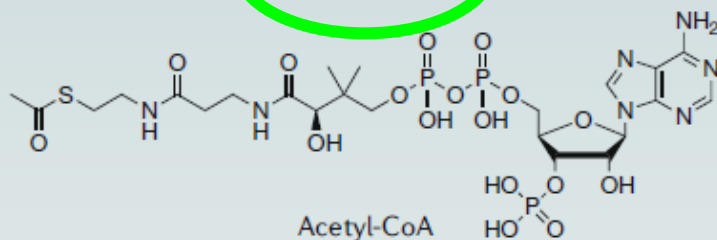
Secondary metabolites are compounds that are not required for the growth or reproduction of an EPF but are produced to confer a selective advantage to these species.

They may present genetic or cell toxicity to other organisms

Starting (substrate) molecules: Acetyl-Coenzyme A and Amino acids

a

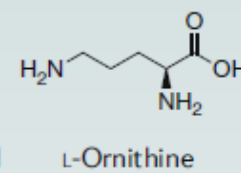
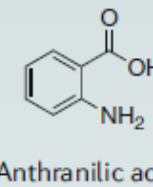
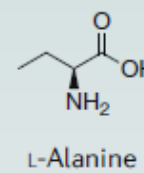
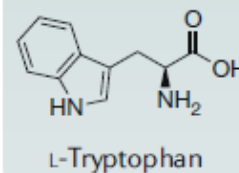
Acyl-CoAs



Amino acids

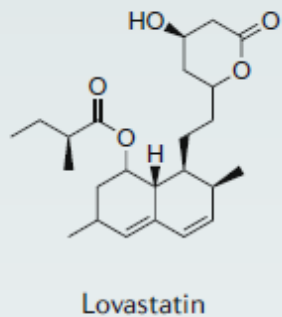
Proteinogenic amino acids

Non-proteinogenic amino acids

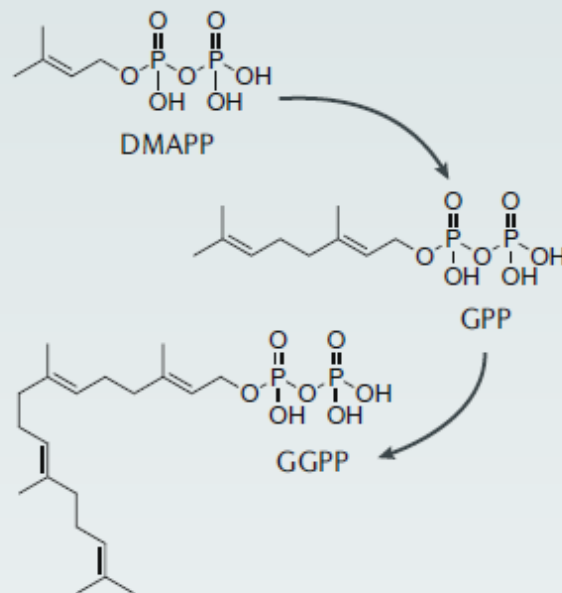




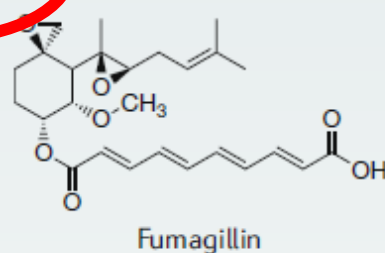
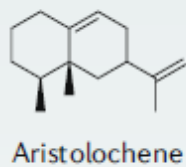
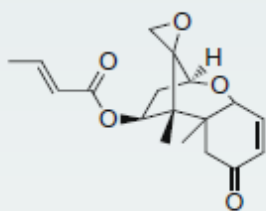
Polyketides



Mevalonate pathway intermediates

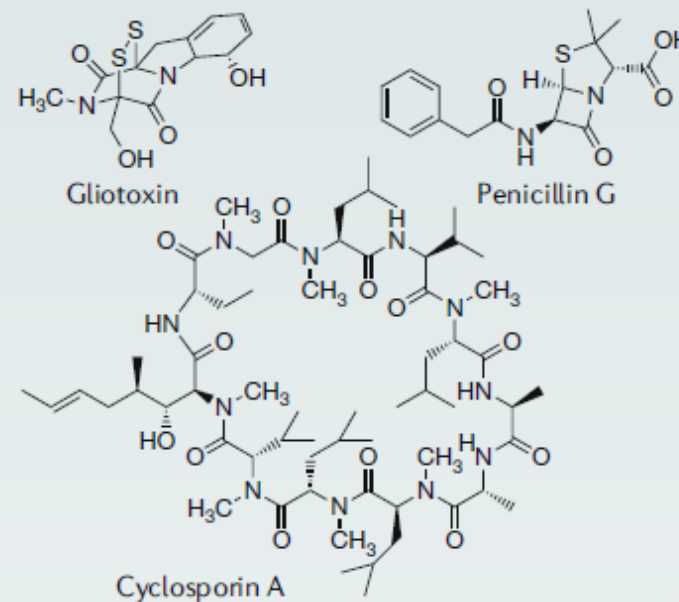


Terpenes

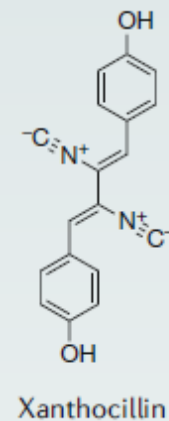


Peptides

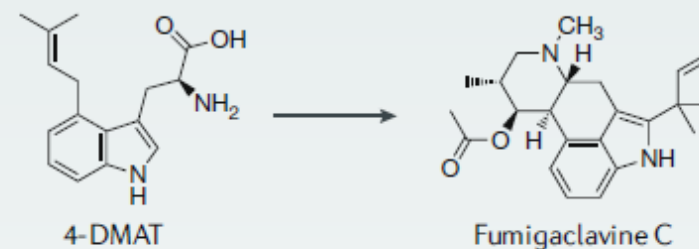
Non-ribosomal peptides



Isocyanides



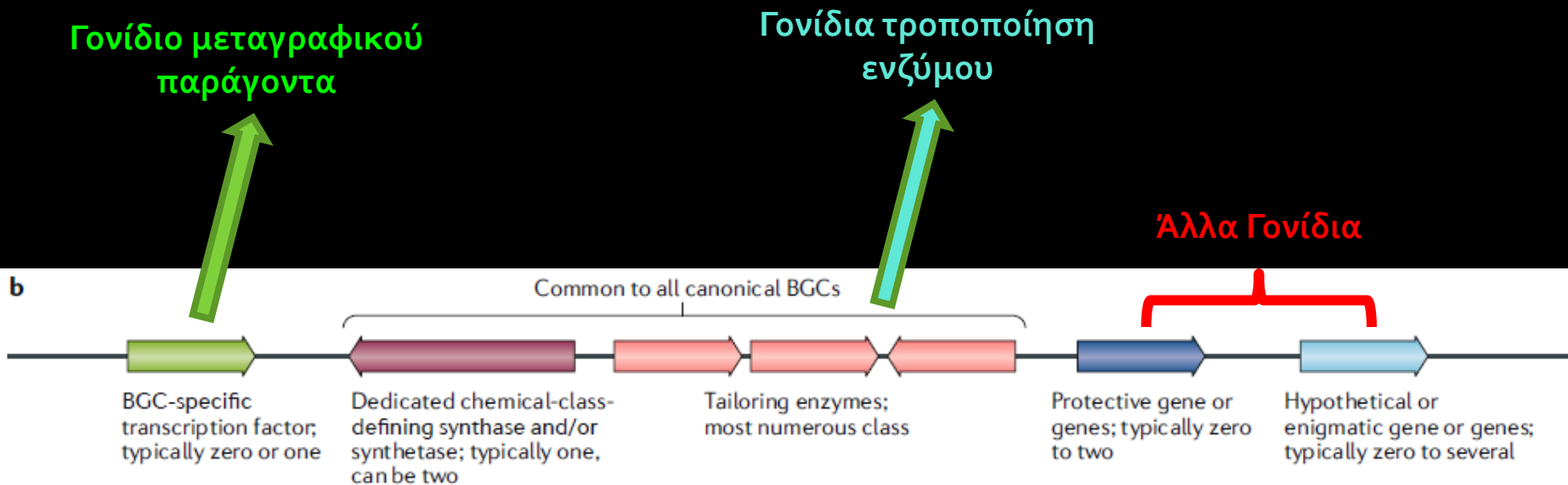
Prenylated tryptophan derivatives





Biosynthetic Gene Cluster (BGC)

Σχηματική απεικόνιση ενός BGC

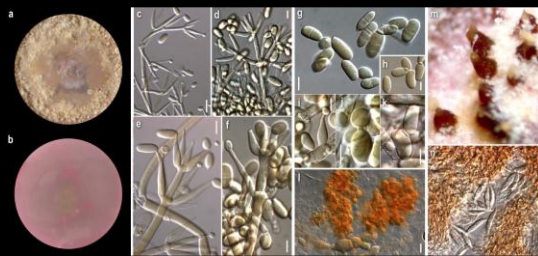


**Γονίδιο(α)
συνθετάσης(ών)**

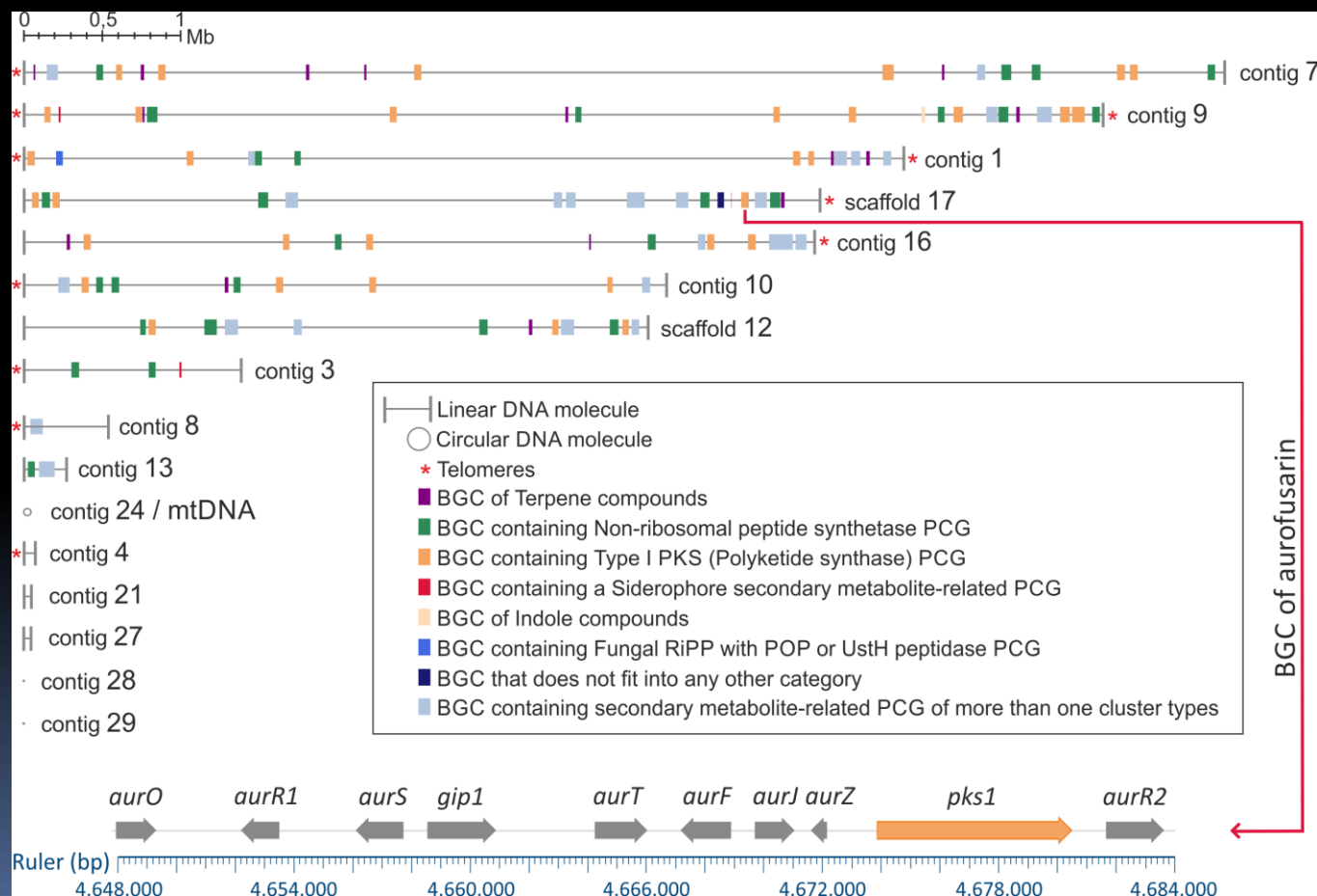
Keller N. (2019) – Nat Rev Microbiol 17, 167–180



Παράδειγμα: BGCs of *Cladobotryum mycophilum*

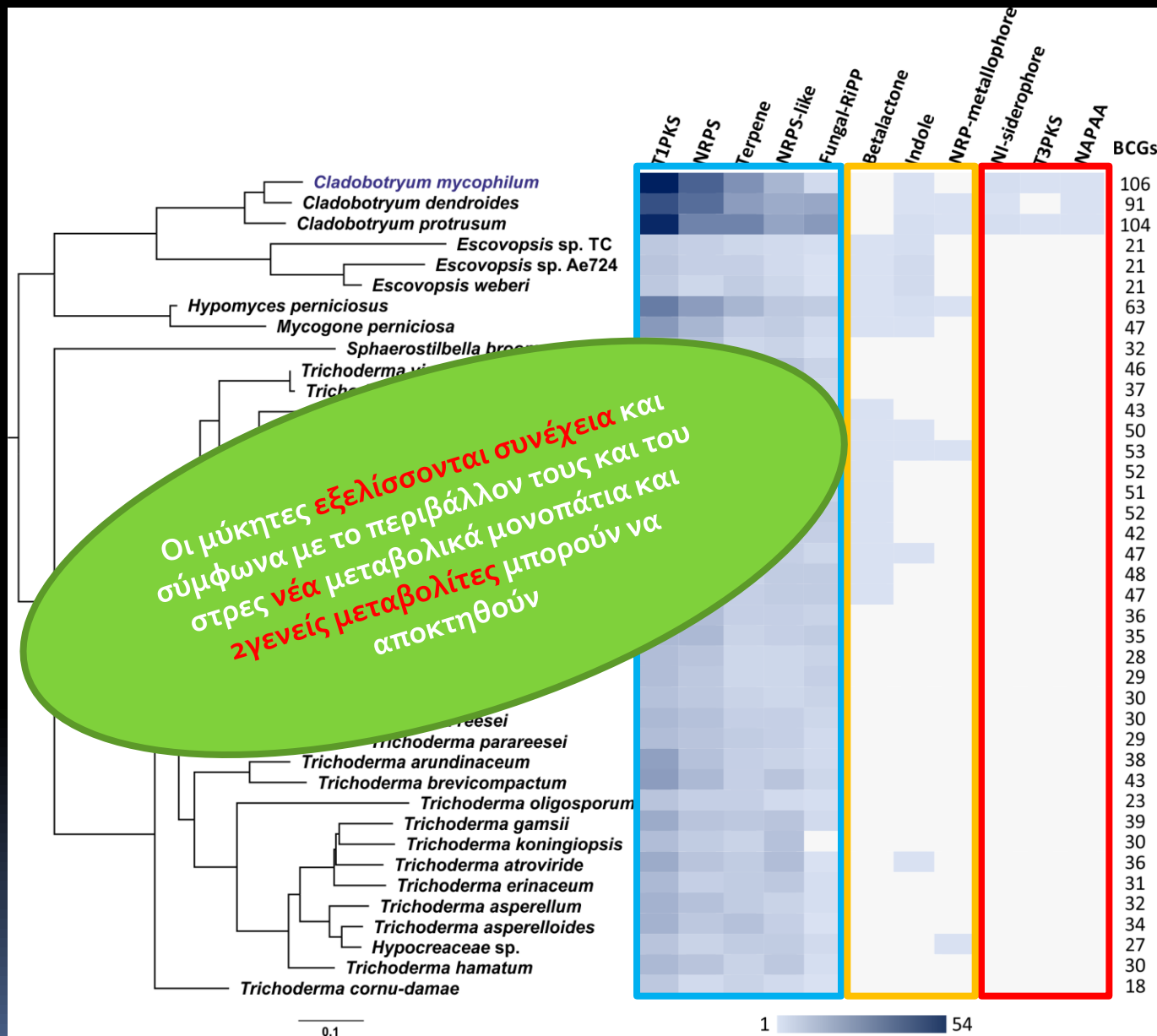


C. mycophilum: μυκόφιλος ασκομύκητας που παρασιτεί στον *Agaricus bisporus*

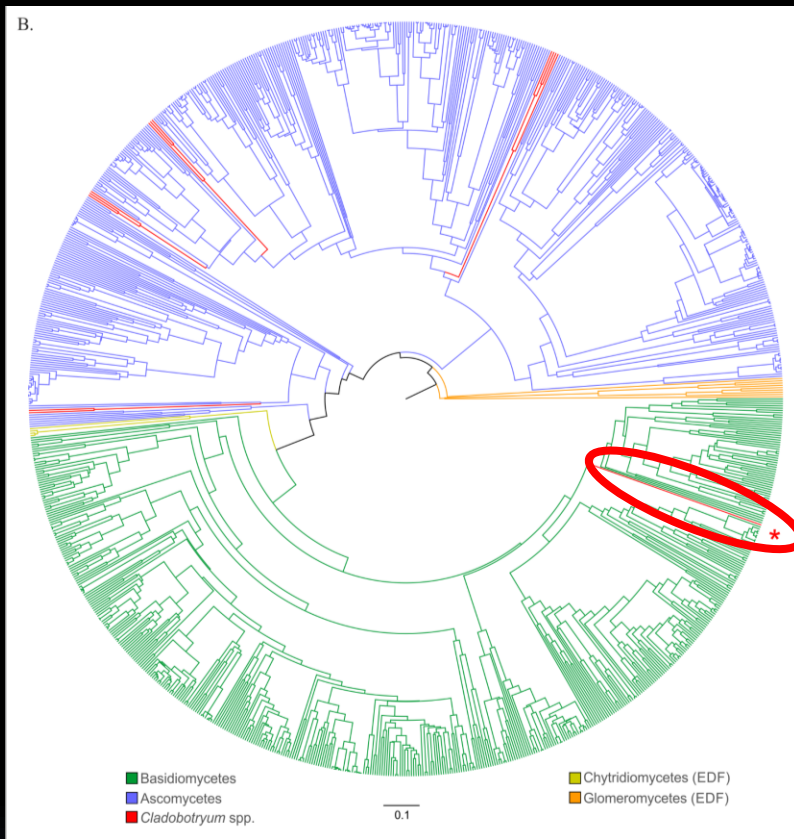


All BGCs of
C. mycophilum: 109

Παράδειγμα: BGCs of *Cladobotryum mycophilum*



Παράδειγμα: BGCs of *Cladobotryum mycophilum*

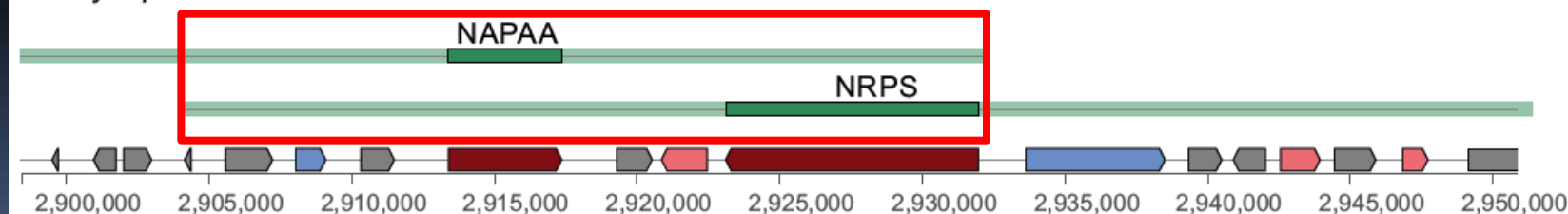


Terpene synthase core gene with a cyclase metal-binding domain – this one related to basidiomycetes, the other 22 terpene PCGs were of ascomycetous origin

Horizontal Gene Transfer
γεγονότα!!!

NAPAA: NRPS-like BGC responsible for the production of non-alpha poly-amino acids, such as ϵ -Poly-L-Lysine

C. mycophilum ATHUM6906 - scaffold 12:



To be continued....